

Aus dem Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Identifizierung und Charakterisierung der Interaktion
von Marburg-Virus VP30 mit den zellulären Proteinen
PIAS1, PIAS2 und SETDB1**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Klüver
aus Marburg

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 17.08.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent:	Prof. Dr. Stephan Becker
1. Korreferent:	Prof. Dr. Markus Schnare

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Filoviren	1
1.1.1.	Taxonomie und Epidemiologie	1
1.1.2.	Pathogenese	5
1.1.3.	Diagnose, Impfung und Behandlung.....	7
1.1.4.	Virusaufbau und Genomstruktur	9
1.1.5.	Virale Proteine	10
1.1.6.	Filoviraler Replikationszyklus	16
1.2.	PIAS-Proteine	19
1.2.1.	Aufbau der PIAS-Proteine	19
1.2.2.	Wirkung der PIAS-Proteine als E3-SUMO-Ligasen	20
1.2.3.	Regulationsmechanismen der PIAS-Proteine	21
1.2.4.	PIAS-Proteine in zellulären Signalwegen	21
1.2.5.	PIAS-Proteine in Virusinfektionen.....	23
1.3.	SETDB1	25
1.3.1.	Aufbau.....	25
1.3.2.	Funktionen	25
1.3.3.	SETDB1 in Virusinfektionen.....	26
1.4.	Fragestellung dieser Arbeit.....	27
2.	MATERIAL	28
2.1.	Chemikalien	28
2.2.	Verbrauchsmaterialien	29
2.3.	Kits	30
2.4.	Geräte	30
2.5.	Puffer	31
2.6.	Lösungen	32
2.7.	Wachstums/Selektionsmedien für Bakterienkultur	32
2.8.	Wachstum/Selektionsmedien für Hefekultur	33
2.9.	Wachstumsmedien für Säugetier/Humanzellen	36
2.10.	Nukleinsäuren	37
2.10.1.	Größenmarker für Agarosegele	37
2.10.2.	Primer für Klonierungen/Sequenzierungen	37
2.10.3.	Primer und Sonden für qRT-PCR	38
2.10.4.	Vektoren	38
2.10.5.	Rekombinante Plasmide	38
2.10.6.	Erstellte Konstrukte	39

2.11. Proteine/Enzyme/Antikörper	39
2.11.1. Enzyme.....	39
2.11.2. Antikörper	40
2.11.3. Affinitätsgele	40
2.11.4. Proteinmarker	40
2.12. Zellen	41
2.13. Software.....	41
3. METHODEN	42
3.1. Molekularbiologische Methoden.....	42
3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
3.1.2. Umschreiben von RNA in DNA (Reverse Transkription)	42
3.1.3. Filoviruspezifische quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion zur Quantifizierung von MARV Genomen	43
3.1.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren	44
3.1.5. Auftrennung von Nukleinsäuren (Agarose-Gelelektrophorese)	45
3.1.6. Restriktionsverdau von DNA	46
3.1.7. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	47
3.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	47
3.1.9. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen.....	48
3.1.10. Selektion rekombinanter Bakterien	48
3.1.11. Kolonie-PCR.....	49
3.1.12. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	49
3.1.13. Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen.....	50
3.1.14. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Hefezellen	50
3.1.15. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	50
3.1.16. Sequenzierung von Nukleinsäuren	51
3.2. Zellbiologische Methoden	51
3.2.1. Kultur von Hefezellen (Y2HGGold-, Y187-Zellen)	51
3.2.2. Hefe-Zwei-Hybrid-Assay.....	52
3.2.3. Kultur von eukaryotischen Zellen (HEK293-, Huh7-, HAP-Zellen)	53
3.2.4. Transfektion von eukaryotischen Zellen mit bakteriellen Plasmiden	54
3.2.5. Ko-Immunpräzipitation (KoIP)	55
3.3. Proteinbiochemische/immunologische Methoden	56
3.3.1. Ernte und Lyse von Hefezellen zur Proteinanalyse	56
3.3.2. Ernte und Lyse von eukaryotischen Zellen zur Proteinanalyse.....	56
3.3.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	56
3.3.4. Elektrophoretischer Proteintransfer (Western Blot)	57
3.3.5. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	58
3.3.6. IFIT2-(ISG54) Firefly Luziferase Reporter-Assay	60
3.3.7. Luziferase-Assay	60
3.4. Virologische Methoden	61
3.4.1. Reverse Genetik	61
3.4.2. Marburg-Virus spezifischer Minigenom-Assay	62
3.4.3. Ebola-Virus spezifischer Minigenom-Assay	64
3.4.4. Infektion von humanen Zellen mit Marburg-Virus Musoke.....	65

4.	ERGEBNISSE	66
4.1.	Hefe-Zwei-Hybrid-Assay des MARV VP30 mit humaner cDNA Bibliothek	66
4.2.	Klonierung und Expression von PIAS1, PIAS2 und SETDB1	69
4.3.	Ko-Immunpräzipitationsanalysen von VP30 mit PIAS1, PIAS2 und SETDB1	71
4.4.	Eingrenzung und Charakterisierung der Bindungsstelle von PIAS2 β auf MARV VP30	73
4.5.	Immunfluoreszenzanalysen zur Bestimmung der Lokalisation der Interaktion von VP30 und PIAS2 β	76
4.6.	Charakterisierung der anti-Interferon-Wirkung der PIAS-Proteine und SETDB1	79
4.7.	Einfluss von PIAS1, PIAS2 und SETDB1 auf die filovirale Transkription und Replikation	81
4.8.	Analyse der Wirkung von PIAS2 im MARV spezifischen Minigenom-Assay unter Verwendung von PIAS2-KO Zellen	85
4.9.	Analyse des Einflusses von PIAS2 bei Infektion von PIAS2-KO und HAP1 Parentalzellen mit MARV Musoke	87
5.	DISKUSSION	90
5.1.	Die Bedeutung von VP30 im viralen Replikationszyklus	90
5.2.	Auswahl von VP30 Interaktionspartnern aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay für weitere Analysen	91
5.2.1.	Funktionen der gefundenen Interaktionspartner	91
5.2.2.	Interaktionsnetzwerk	92
5.3.	Rolle von PIAS1 und PIAS2 im filoviralen Replikationszyklus	93
5.3.1.	Interaktion von PIAS1 mit anderen Viren	93
5.3.2.	Interaktion von PIAS2 mit anderen Viren	93
5.3.3.	Bestätigung der Interaktion von PIAS1 und PIAS2 mit VP30	93
5.3.4.	Charakterisierung der Bindungsstelle auf MARV VP30	94
5.3.1.	Intrazelluläre Lokalisation der PIAS2-VP30-Interaktion	96
5.3.2.	Charakterisierung der Anti-Interferon-Wirkung von PIAS1 und PIAS2 in Bezug auf IFIT2	96
5.3.3.	Einfluss von PIAS1 und PIAS2 auf die Funktion von VP30 als Transkriptionsfaktor	98
5.3.1.	Einfluss von PIAS2 während der Virusinfektion	101
5.3.1.	Wirkung von PIAS1 und PIAS2 als E3-Sumo-Ligasen	101
5.4.	Rolle von SETDB1 im filoviralen Replikationszyklus	102
5.4.1.	Interaktion von SETDB1 mit anderen Viren	102
5.4.2.	Bestätigung der Interaktion von SETDB1 mit VP30	102
5.4.3.	Charakterisierung der Wirkung von SETDB1 in Bezug auf IFIT2	102
5.4.4.	Einfluss von SETDB1 auf die Funktion von VP30 als Transkriptionsfaktor	103
5.5.	Mögliche Rollen von RBBP6 und HECTD1 im filoviralen Replikationszyklus	104
5.5.1.	RBBP6	104
5.5.2.	HECTD1	104
5.6.	Abschlussbetrachtungen und Arbeitsmodell für die Interaktion von MARV VP30 und PIAS	105

6.	ZUSAMMENFASSUNG	108
7.	SUMMARY	109
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	110
9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	132
10.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	133
11.	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	135
12.	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	136
13.	DANKSAGUNG	137

1. Einleitung

1.1. Filoviren

1.1.1. Taxonomie und Epidemiologie

Das Marburg-Virus und das Ebola-Virus gehören zur Virusfamilie der *Filoviridae* (Kuhn *et al.*, 2010). Der Name „Filovirus“ (von lateinisch „filum“ = Faden) geht auf die fadenförmige Erscheinungsform der Viruspartikel in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zurück (Abbildung 4) (Kiley *et al.*, 1982; Kuhn *et al.*, 2010). Die Familie der *Filoviridae* gehört zusammen mit den Familien der *Paramyxoviridae* (Bsp. Masernvirus, Nipahvirus), *Rhabdoviridae* (Bsp. Rabiesvirus), *Bornaviridae* (Bsp. Bornavirus) zur Ordnung der *Mononegavirales* (Abbildung 1) (Afonso *et al.*, 2016). Ihnen allen gemein ist ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes, Negativstrang-RNA-Genom. Eine gute Übersicht zu Filoviren geben (Slenczka and Klenk, 2007; Brauburger *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015; Baseler *et al.*, 2017).

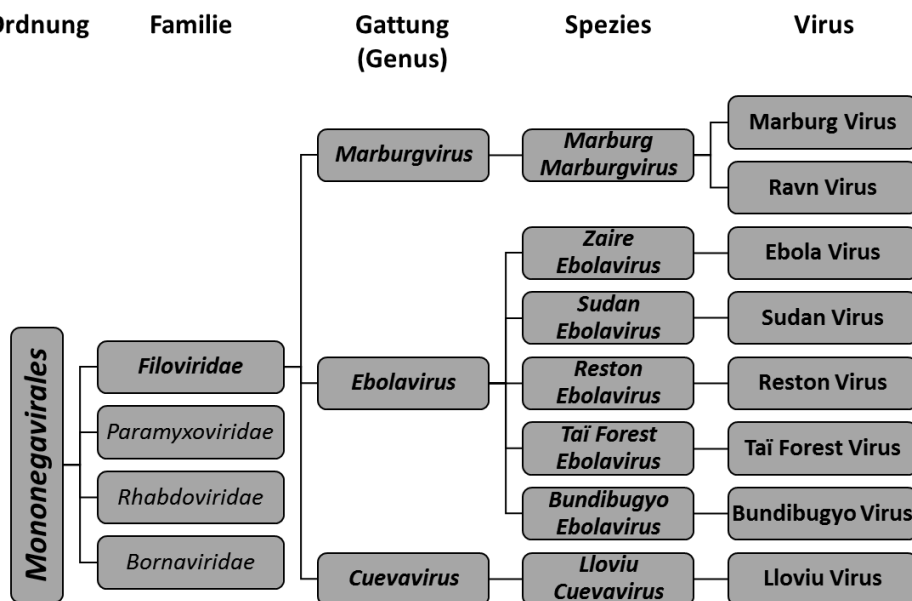


Abbildung 1: Taxonomie der Filoviren.

Taxonomie der *Mononegavirales* und Einordnung der *Filoviridae* nach (Kuhn *et al.*, 2010).

Die Familie der *Filoviridae* wird unterteilt in die Gattungen *Marburgvirus*, *Ebolavirus* und *Cuevavirus* (Abbildung 1) (Kuhn *et al.*, 2010). Zur Gattung *Marburgvirus* gehört die Spezies *Marburg Marburgvirus* mit den beiden Viren Marburg-Virus (MARV) und Ravn-Virus (RAVN). Zur Gattung *Ebolavirus* gehören die Spezies *Zaire Ebolavirus* mit dem Ebola-Virus (EBOV), die Spezies *Sudan Ebolavirus* mit dem Sudan-Virus (SUDV), die Spezies *Reston Ebolavirus* mit dem Reston-Virus (RESTV), *Tai Forest Ebolavirus* mit dem Tai Forest-Virus (TAFV) und die Spezies *Bundibugyo Ebolavirus* mit dem Bundibugyo-Virus (BDBV). Zur vorläufigen Gattung *Cuevavirus* zählt die Spezies *Lloviu Cuevavirus* mit dem Lloviu-Virus (LLOV).

1.1.1.1. Gattung Marburgvirus

Der erste Ausbruch einer Marburg-Virus Infektion ereignete sich im Jahr 1967 parallel in Marburg, Frankfurt und Belgrad (Siegert *et al.*, 1968; Siegert, Shu and Slenczka, 1968; Slenczka *et al.*, 1968). Es kam zu schweren Fiebererkrankungen einhergehend mit gastro-intestinalen Symptomen und erhöhter Blutungsneigung. Die Übertragung erfolgte über infizierte Grüne Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) aus Uganda (Abbildung 2), die für die Herstellung von Impfstoffen benötigt wurden. Es kam zu Infektionen von Versuchstieren, Tierpflegern, Labormitarbeitern und Klinikpersonal, die mit infektiösen Organen und Körperflüssigkeiten Kontakt hatten. Der bis dahin unbekannte Erreger wurde von den Virologen Werner Slenczka, Rudolf Siegert und Dietrich Peters in Marburg und Hamburg isoliert, als Virus identifiziert und nach der Stadt mit der höchsten Fallzahl, Marburg-Virus benannt (Siegert *et al.*, 1968; Siegert, Shu and Slenczka, 1968; Slenczka *et al.*, 1968). Bei diesem Ausbruch kam es zu 32 Infektionen, von denen 7 tödlich verliefen, was einer Letalitätssrate (=case fatality rate, CFR) von 22% entspricht (Martini, 1973; Brauburger *et al.*, 2012). In späteren Jahren kam es wiederholt zu Ausbrüchen und zu Fällen von importierten Infektionen (Abbildung 2) (Brauburger *et al.*, 2012; CDC, Center for Disease Control and Prevention, 2014; WHO, 2017).

So kam es zu Ausbrüchen in Südafrika (1975) (Gear *et al.*, 1975), in Kenia (1980, 1987) (Smith *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1996), in der UdSSR (1988, 1990 Laborunfälle) (Nikiforov *et al.*, 1994; Kuhn, 2008), in der Demokratischen Republik Kongo (1998-2000) (Bausch *et al.*, 2006), in Angola (2004-2005) (Towner *et al.*, 2006), in Uganda (2007) (Adjemian *et al.*, 2011), in den USA und in den Niederlanden (2008, importierte Fälle aus Uganda) (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009; Timen *et al.*, 2009), sowie in Uganda (2012, 2014, 2017) (Albariño *et al.*, 2013) (Abbildung 2).

Im Jahr 1996 wurde darüber hinaus festgestellt, dass das Virus, welches 1987 für eine Einzelinfektion verantwortlich war, einer eigenen Spezies zugeordnet werden konnte, der Spezies Ravn Marburgvirus (Johnson *et al.*, 1996).

Das Erregerreservoir der Filoviren war lange Zeit unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass der Verzehr von Buschfleisch, von Wildtieren wie z. B. Affen, Fledertieren etc. und der Besuch von Höhlen (z. B. durch Minenarbeiter und Touristen) eine Rolle spielen. Schließlich wurden fruchtfressende Nilflughunde (*Rousettus aegyptiacus*) als Erregerreservoir identifiziert (Leroy *et al.*, 2005) und es konnte MARV aus diesen Flughunden isoliert werden (Towner *et al.*, 2007, 2009). Nilflughunde haben ein großes Verbreitungsgebiet in Afrika (Abbildung 2). Dies erklärt auch die Bedeutung von Buschfleisch (Flughunde) und Höhlen (Nistplätze der Flughunde, z. B. *Kitum Cave*, Kenia; *Kitaka Cave*, Uganda) für die Übertragung (Brauburger *et al.*, 2012).

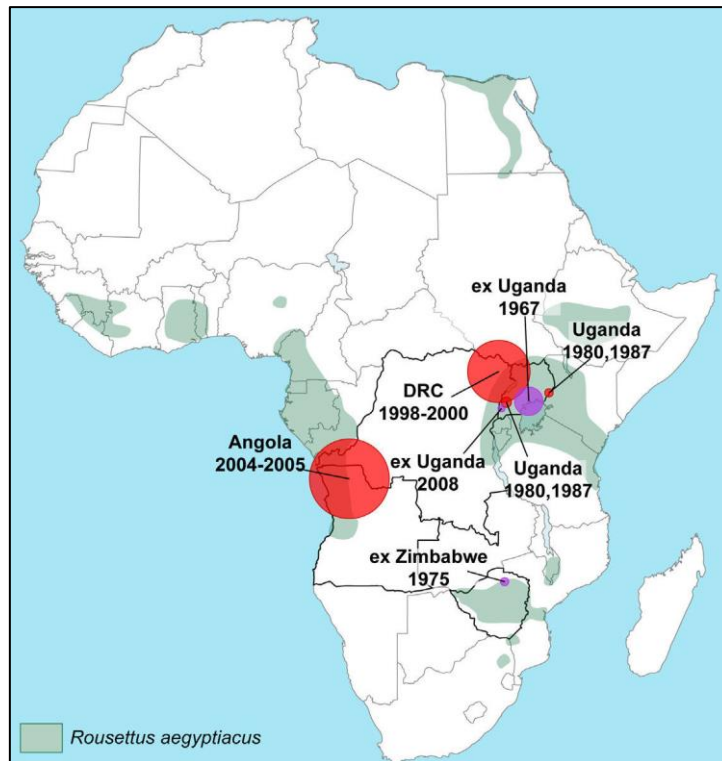


Abbildung 2: Geographische Lage von Marburg-Virus Ausbrüchen von 1967-2012 und Verbreitung des Nilflughundes (*Rousettus aegyptiacus*) in Afrika.

Lage von MARV Ausbrüchen (Kreise entsprechen den Fallzahlen des Ausbruchs), grüngefärbte Bereiche zeigen die Verbreitung des Flughundes *Rousettus aegyptiacus*. Rote Kreise zeigen Ausbruchsgebiete. Violette Kreise zeigen den Ursprung von exportierten Fällen. Verändert nach (Brauburger *et al.*, 2012).

Die geographische Verteilung der Filovirusausbrüche zeigt, dass diese gehäuft entlang des Äquators auftreten, was auf ein Endemiegebiet in diesem Bereich hindeutet (Abbildung 2, Abbildung 3) (Pigott *et al.*, 2014, 2015). Dies deckt sich zum Teil mit dem Verbreitungsgebiet der Flughunde (Abbildung 2) und wird auch durch seroepidemiologische Ergebnisse gestützt, die zeigen, dass filoviruspezifische Antikörper in Menschen in diesem Bereich gehäuft vorkommen (Becker *et al.*, 1992).

1.1.1.2. Gattung Ebolavirus

Das Ebola-Virus wurde zum ersten Mal während eines Ausbruchs 1976 beschrieben (Bowen *et al.*, 1977; Johnson *et al.*, 1977; Brès, 1978; Burke, Decker and Ghysebrechts, 1978). Dabei kam es zeitgleich zu Ausbrüchen in der Demokratischen Republik Kongo (DRC) und im Sudan (Südsudan) (Abbildung 3). In der Demokratischen Republik Kongo wurden 318 Menschen infiziert, von denen 280 verstarben (CFR = 88%). Im Sudan wurden 284 Menschen infiziert von denen 151 verstarben (CFR = 53%). Es zeigte sich, dass ein Virus für die Krankheiten verantwortlich war, welches morphologisch dem 1967 entdeckten Marburg-Virus stark ähnelte, serologisch jedoch von diesem unterschieden werden konnte (Bowen *et al.*, 1977; Johnson *et al.*, 1977). Die ersten Infektionsfälle traten in der Nähe des Flusses Ebola auf. Daher wurde dieses Virus Ebola-Virus

genannt. Später konnte gezeigt werden, dass sich die Viren unterschieden, die für die beiden Ausbrüche verantwortlich waren (McCormick *et al.*, 1983; Richman *et al.*, 1983). Die Viren wurden daher in zwei verschiedene Spezies einsortiert, *Zaire* und *Sudan Ebolavirus*.

Im Jahr 1989 wurde in Reston, Virginia (USA) ein Ebola-verwandtes Virus aus importierten Affen von den Philippinen isoliert (Jahrling *et al.*, 1990) und einer eigenen Spezies *Reston Ebolavirus* zugeordnet. 1994 kam es bei der Autopsie eines Affen im Taï Forest in der Republik Côte d'Ivoire zu einer Infektion mit EBOV (Le Guenno *et al.*, 1995). Es zeigte sich, dass auch das hier isolierte Virus einer eigenen Spezies *Taï Forest Ebolavirus* zugeordnet werden konnte. Im Jahr 2007 konnte bei einem EBOV Ausbruch in Uganda die bisher zuletzt identifizierte Spezies *Bundibugyo Ebolavirus* isoliert werden (Towner *et al.*, 2008; MacNeil *et al.*, 2011).

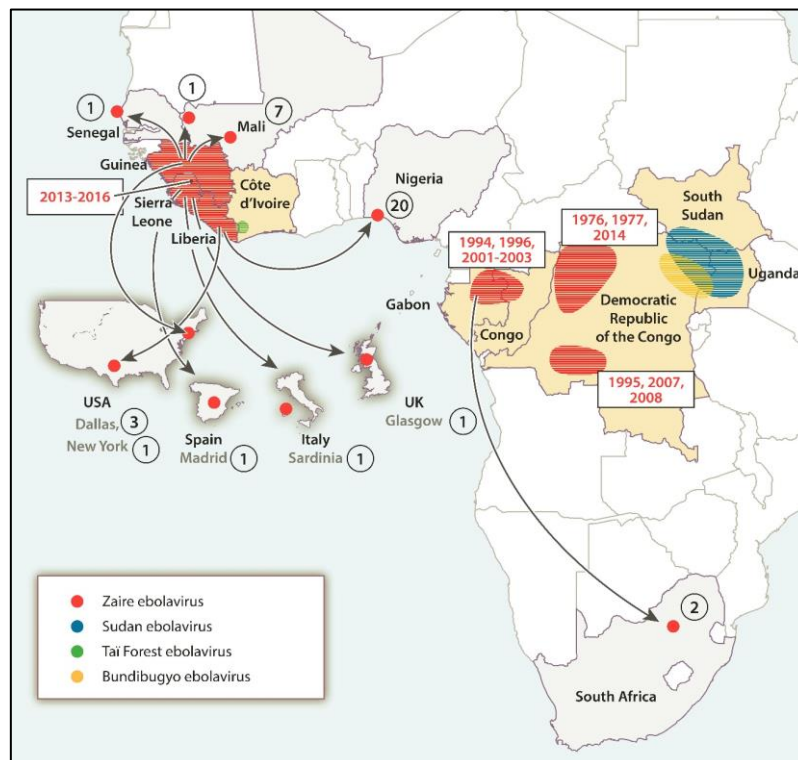


Abbildung 3: Geographische Lage von Ebola-Virus Ausbrüchen von 1976-August 2016.

Die Karte zeigt die bekannten humanen EBOV Ausbrüche von vier unterschiedlichen Spezies. Die eingekreisten Nummern zeigen EBOV Fälle, die durch Reisen von infizierten Personen in die jeweiligen Länder aufgetreten sind. Verändert nach (Baseler *et al.*, 2017; CDC, 2017)

Es zeigte sich, dass sich die unterschiedlichen Ebolavirus Spezies hinsichtlich der Schwere der ausgelösten Erkrankung, der Letalitätssrate und auf molekularer Ebene unterscheiden. Beispielsweise wurde für *Reston Ebolavirus* bisher keine Erkrankung berichtet. Neben den genannten dokumentierten Erstausrüchen der unterschiedlichen Spezies kam es zu einer Reihe von *Ebolavirus* Ausbrüchen (Abbildung 3) (CDC, 2017).

Für die meisten Ausbrüche ist die Spezies *Zaire Ebolavirus* verantwortlich (Abbildung 3). So auch bei dem bisher größten Ebola-Virus Ausbruch von 2014-2016 in Westafrika (Abbildung 3) (Uyeki *et al.*, 2016; WHO Ebola Response Team, 2016). Dabei kam es zu mehr als 28.000 Fällen und 11.000 Toten (CFR = 40%). Es zeigten sich auch einige Unterschiede im Vergleich mit vorangegangenen Ausbrüchen in Zentralafrika. Neben der deutlich größeren Fallzahl wiesen die isolierten Viren Mutationen in verschiedenen viralen Genen auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektiosität und das Wachstum der Viren sich im Verlauf des Ausbruchs veränderten. Die Mutationen führten zu einer verbesserten viralen Fitness. (Diehl *et al.*, 2016; Urbanowicz *et al.*, 2016; Dietzel *et al.*, 2017). Gleichzeitig wurde zum ersten Mal ein experimenteller Ebola-Virus Impfstoff in großem Umfang erfolgreich eingesetzt (Henao-Restrepo *et al.*, 2017). Der letzte Ausbruch ereignete sich im Jahr 2017 ebenfalls in der Demokratischen Republik Kongo. Für EBOV wurde gezeigt, dass Hammerkopf- (*Hypsignathus monstrosus*), Epoletten- (*Epomops franqueti*) und Halskrausenflughunde (*Myonycteris torquata*) eine Rolle als Reservoir spielen könnten (Leroy *et al.*, 2005), da EBOV RNA in diesen Flughunden nachgewiesen wurde. Die Isolation infektiöser Viren war bislang nicht erfolgreich.

1.1.1.3. Gattung Cuevavirus

Im Jahr 2011 wurden aus insektenfressenden Schreiber-Flughunden (*Miniopterus schreibersii*), die aus einer Höhle in Spanien stammten (*Cueva del Lloviu, Spanien*), Filovirus-Genomsequenzen isoliert, die sich stark von den Gattungen *Marburgvirus* und *Ebolavirus* unterschieden. Das potentielle neue Filovirus wurde Lloviu Virus genannt und in eine eigene Gattung *Cuevavirus* mit der Spezies *Lloviu Cuevavirus* einsortiert (Abbildung 1) (Kuhn *et al.*, 2010; Negredo *et al.*, 2011). Vermehrungsfähiges Virus konnte bisher jedoch nicht isoliert werden (Negredo *et al.*, 2011; Burk *et al.*, 2016).

1.1.2. Pathogenese

Infektionen mit MARV oder EBOV führen im Menschen und nicht-menschlichen Primaten zu schweren Fiebererkrankungen, die häufig tödlich verlaufen. Die Beschreibung der Pathogenese erfolgt im Folgenden für MARV und EBOV gemeinsam, sofern nicht anders angegeben.

Eine Infektion mit Filoviren erfolgt meist über Virus-haltige Körperflüssigkeiten, wie Blut (z. B. durch kontaminierte Nadeln), Erbrochenes, Schweiß, Stuhl, Urin von erkrankten oder verstorbenen Personen oder Tieren. Eintrittspforten können Schleimhäute, sowie Hautverletzungen und Nadelpunktionsstellen sein (Masfique Mehedi *et al.*, 2011; Brauburger *et al.*, 2012). Bei MARV Infektionen wurden Inkubationszeiten von 3-21 Tagen berichtet (Masfique Mehedi *et al.*, 2011; Brauburger *et al.*, 2012) während bei EBOV Infektionen Inkubationszeiten von 6-15 Tagen berichtet wurden (Ajelli *et al.*, 2015; Baseler *et al.*, 2017). In der frühen Phase der Erkrankung zeigen Patienten

unspezifische, grippe-ähnliche Symptome, wie hohes Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Erschöpfung. Diesen folgen häufig schwere gastrointestinale Symptome, wie Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen und wässrige Durchfälle (Brauburger *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015). Oft kommt es zu Enanthenen, Pharyngitis und einem charakteristischen makulopapulösen Hautausschlag (Geisbert *et al.*, 2003; Colebunders *et al.*, 2007).

Im weiteren Verlauf der Erkrankung bleiben viele initiale Symptome erhalten, inklusive des hohen Fiebers. Die Patienten können neurologische Symptome entwickeln. Außerdem kann es zu hämorrhagischen Manifestationen kommen, wie Petechien, Schleimhautblutungen, blutigem Erbrechen oder Durchfällen (Brauburger *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015). In dieser Phase sind viele innere Organe, wie Leber, Nieren, Lunge, Milz und Lymphknoten von Blutungen und Organ-Nekrosen betroffen. Der Tod tritt häufig durch Multiorganversagen oder hypovolämischen Schock 8-16 Tage nach Beginn der ersten Symptome ein (Martini *et al.*, 1968; Kortepeter, Bausch and Bray, 2011; Masfique Mehedi *et al.*, 2011), im EBOV Ausbruch von 2014 meist nach etwa 6-7 Tagen (Ajelli *et al.*, 2015).

Überlebende unterliegen häufig einer langen Rekonvaleszenzzeit. Außerdem kann es zu Sekundärinfektionen kommen und zur Persistenz von Virus in immunologisch privilegierten Bereichen wie Augen und Hoden, wobei die Persistenz in der Samenflüssigkeit zu einer sexuellen Übertragung führen kann (Martini and Schmidt, 1968; Smith *et al.*, 1982; Rowe *et al.*, 1999; Varkey *et al.*, 2015; Brainard *et al.*, 2016; Baseler *et al.*, 2017; Deen *et al.*, 2017).

Die Filovirusinfektion beginnt auf zellulärer Ebene mit der Anlagerung und dem Eintritt von Viren in Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen (Feldmann *et al.*, 1996; Stroher *et al.*, 2001; Bosio *et al.*, 2003; Geisbert *et al.*, 2003; Brauburger *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015; Baseler *et al.*, 2017). Durch Einwanderung der infizierten Zellen in lokale Lymphknoten und über die Blut- und Lymphgefäße in sekundäre Organe kommt es zur weiteren Verteilung von infizierten Zellen und Viren im Körper (Schnittler and Feldmann, 1998; Geisbert *et al.*, 2003).

Neben phagozytierenden Zellen werden eine Reihe weiterer Zellen effektiv infiziert, darunter Hepatozyten, Nierenzellen und Fibroblasten (Brauburger *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015).

Bei fatalen Verläufen kommt es häufig zu einer fehlregulierten Immunantwort. Infizierte Makrophagen sezernieren MIP1- α und MCP-1, welche eine Invasion weiterer Makrophagen und Monozyten zum Ort der Infektion bewirken (Alves *et al.*, 2010; Brauburger *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015). Infizierte Monozyten und Makrophagen sezernieren unkontrolliert eine Reihe von Zytokinen, wie TNF α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6,

IL-8, IL-15, IL-16, IL-1 Rezeptor Antagonist, TNF Rezeptor, IL10, CCL3, CCL4, CXCL10 (Stroher *et al.*, 2001; Rougeron *et al.*, 2015), was zu einer Dysregulation der Immunantwort und zum Zytokin-Sturm führt. Die Gefäßpermeabilität wird durch TNF- α , NO und weitere Mediatoren gesteigert, was zum sog. *Vascular-Leak-Syndrome* führt (Feldmann *et al.*, 1996). Vermittelt durch MCP-1 und IL-8 kommt es zur Einwanderung von Makrophagen und Neutrophilen und zu Gewebsschädigungen (Gerszten *et al.*, 1999; Rougeron *et al.*, 2015). Organnekrosen vor allem in der Leber und der Niere sind die Folge. Außerdem führt die Sezernierung von Gewebefaktoren durch Makrophagen zu einer disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC) (Rougeron *et al.*, 2015). Es entstehen Thromben im ganzen Körper und der Verbrauch an Gerinnungsfaktoren führt zu Blutungen. Eine wichtige Rolle spielen auch die viralen immunmodulatorischen Proteine (1.1.5.) MARV und EBOV VP35, sowie MARV VP40 und EBOV VP24, die nachhaltig die angeborene Immunantwort stören.

Außerdem hemmt die Infektion von monozytären dendritischen Zellen deren Aktivierung, die Freisetzung von Zytokinen, sowie die Aktivierung von T-Zellen (Bosio *et al.*, 2003; Brauburger *et al.*, 2012). Die Infektion von Makrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen und deren fehlerhafte Aktivierung verursacht zudem eine massive Apoptose von Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (Geisbert *et al.*, 2003; Wauquier *et al.*, 2010; Brauburger *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015). Eine gestörte adaptive Immunantwort ist die Folge. Im Gegensatz dazu sind nicht-fatale Verläufe häufig gekennzeichnet von einer frühen Immunantwort, moderater Entzündungsreaktion und der Entwicklung einer robusten adaptiven Immunantwort (Rougeron *et al.*, 2015).

1.1.3. Diagnose, Impfung und Behandlung

Der direkte Virusnachweis erfolgt meist durch eine Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR), die spezifisch für die virale RNA des Virusgenoms ist. Aktuelle Methoden sind dabei für den Feldeinsatz geeignet und kombinieren Sequenzen von MARV und EBOV, sodass hier schnell und valide eine differenzierte Aussage getroffen werden kann (Drosten *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 2011; Boisen *et al.*, 2015; Strecker *et al.*, 2015; Dedkov *et al.*, 2016; Kaushik *et al.*, 2016; Kerber *et al.*, 2016). Zur Bestätigung werden virusspezifische Antigene mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nachgewiesen (Boisen *et al.*, 2015; Rougeron *et al.*, 2015). Als weitere Nachweismethoden kommen die Anzucht und folgende Virusisolation und ein Nachweis mittels Elektronenmikroskopie in Betracht. Der indirekte Nachweis wird mittels indirekter Immunfluoreszenz oder ELISA-basierter Detektion von Antikörpern geführt. Antikörper-ELISAs dienen der Analyse der Immunantwort während der akuten Infektion, der Rekonvaleszenz oder im Rahmen der Wirksamkeitstestung von Impfungen (Nakayama *et al.*, 2010; Krähling *et al.*, 2016).

Bisher steht keine spezifische Therapie zur Behandlung von Filovirusinfektionen zur Verfügung. Die Behandlung beschränkt sich daher auf unterstützende symptomatische Behandlungsmaßnahmen, wie erhöhte Flüssigkeits- und Elektrolytzufuhr, um die gastrointestinal bedingten Verluste auszugleichen, sowie Analgetika und psychosoziale Unterstützung (Sterk, 2008; Roddy *et al.*, 2012; Rougeron *et al.*, 2015; Baseler *et al.*, 2017).

Es existieren eine Reihe von experimentellen Behandlungsmöglichkeiten. In der Vergangenheit wurden Rekonvaleszenz-Seren und Interferone eingesetzt um Infizierte zu behandeln, wobei ihre Wirksamkeit nicht eindeutig belegt werden konnte (Rougeron *et al.*, 2015). Während des EBOV Ausbruchs von 2014-2016 wurde Favipiravir, ein Nukleosid-Analogon, eingesetzt, um die Virusreplikation zu reduzieren. Es konnte jedoch kein eindeutiger Effekt gezeigt werden (Sissoko *et al.*, 2016). ZMapp, ein Cocktail aus drei monoklonalen Antikörpern, wurde im Rahmen des EBOV Ausbruchs von 2014 zur Behandlung einiger Patienten eingesetzt (Qiu *et al.*, 2014). Bisherige Studien zeigen jedoch nur leichte Verbesserungen bei Behandlung mit ZMapp (PREVAIL II Writing Group *et al.*, 2016). Neben diesen Behandlungen existieren eine Reihe weiterer Medikamente gegen MARV und EBOV, die in vorklinischen Studien getestet wurden, wie z. B. Stoffe, welche die virale mRNA-Synthese hemmen (Geisbert *et al.*, 2006, 2010), Negativstrang-Nukleotide, die zu einem Abbau von RNAs führen (Iversen *et al.*, 2012), oder Inhibitoren der viralen Polymerase, welche die Replikation hemmen (Warren *et al.*, 2014, 2016; Biedenkopf *et al.*, 2017).

Für MARV und EBOV wurden eine Reihe von Impfstoffen entwickelt (Baseler *et al.*, 2017; Reynolds and Marzi, 2017), von denen sich einige bereits in der klinischen Phase 3 befinden. Einer dieser Impfstoffe, rVSV-ZEBOV, stellt ein rekombinantes Vesikuläres Stomatitis Virus dar, welches das EBOV Glykoprotein exprimiert (rVSV-ZEBOV) (Jones *et al.*, 2005). rVSV-ZEBOV wurde bereits im EBOV Ausbruch von 2014 in Form einer Ring-Vakzinierung getestet (Gsell *et al.*, 2017; Henao-Restrepo *et al.*, 2017). Dabei wurde der Impfstoff mehr als 7000 Personen verabreicht und zeigte eine Wirksamkeit von 100%. Daneben wird der Impfstoff aktuell in Studien in Sierra Leone und Liberia getestet. Eine weitere Vakzine gegen EBOV besteht aus dem vektorisierten, nicht-replikationsfähigen Schimpansen-Adenovirus Typ 3, welches ebenfalls EBOV GP exprimiert (Stanley *et al.*, 2014; Baseler *et al.*, 2017). Diese Vakzine wird ebenfalls im Rahmen einer klinischen Phase 3 Studie in Liberia getestet. Eine weitere Vakzine, mit dem Namen MVA-BN-Filo, basiert auf dem modifizierten Vaccinia Virus Stamm Ankara (MVA) und exprimiert EBOV GP, SUDV GP, MARV GP und TAFV NP (Tapia *et al.*, 2016) und wäre somit in der Lage gegen MARV und EBOV zu schützen.

1.1.4. Virusaufbau und Genomstruktur

Filoviren sind etwa 90 nm breit und haben eine durchschnittliche Länge von 900 nm (MARV) bzw. 1000 nm (EBOV) (Abbildung 4A), wobei die Länge variabel ist (Bharat *et al.*, 2011, 2012; Brauburger *et al.*, 2012). Filoviruspartikel können langgestreckt, zirkulär, oder in Form eines Hirtenstabes vorliegen (Abbildung 4A und B).

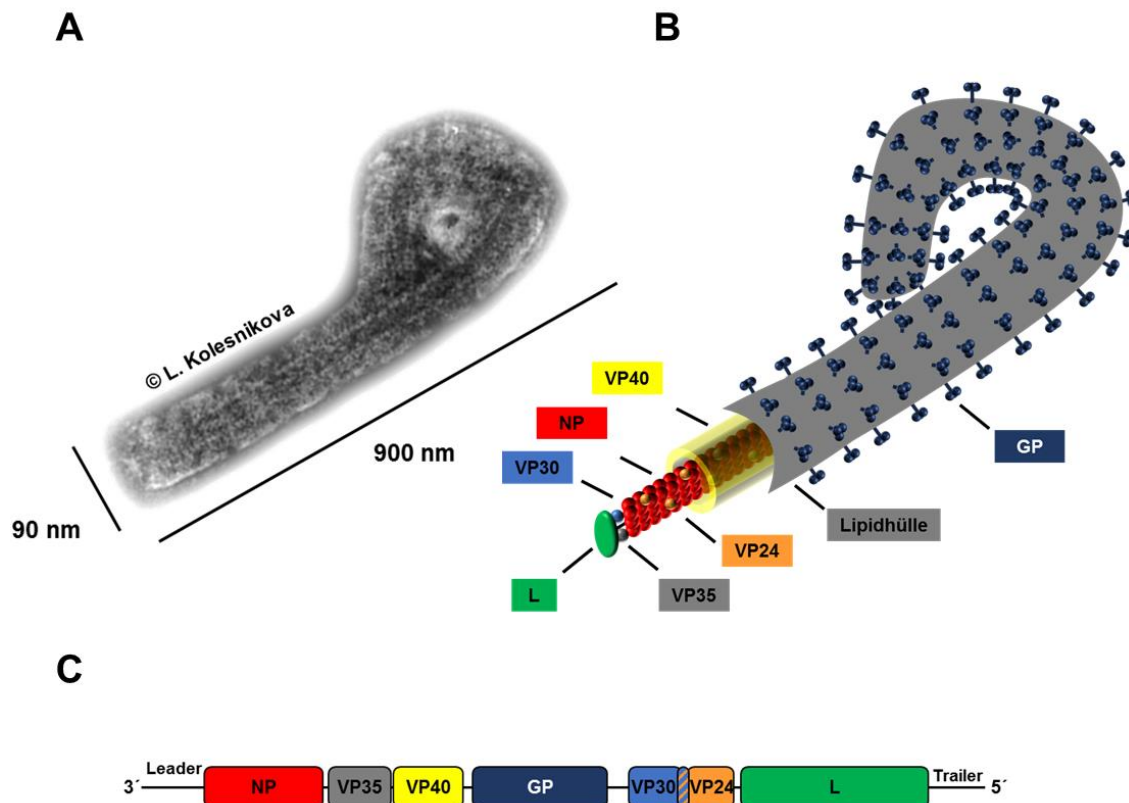


Abbildung 4: MARV Partikelbau und Genomstruktur.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines MARV Partikels, „Hirtenstabmorphologie“ (zur Verfügung gestellt von Dr. L. Kolesnikova, Institut für Virologie, Marburg). (B) Schematischer Aufbau eines MARV Partikels. (C) Genomstruktur des MARV. Das einzelsträngige RNA-Genom in negativer Orientierung kodiert für 7 virale Proteine. Die Gene von VP30 und VP24 überlappen. Die 3'-Leader und 5'-Trailer Bereiche enthalten wichtige Signale für die Regulation von Transkription, Replikation und Verpackung des Genoms.

Die Viruspartikel enthalten ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung, mit einer Länge von etwa 19 Kilobasen (Abbildung 4C). Dieses kodiert für 7 monocistronische Gene in linearer Anordnung: das Nukleoprotein (NP), Virion Protein (VP) 35, VP40, das Glykoprotein (GP), VP30, VP24, und die RNA-abhängige RNA-Polymerase L (Feldmann *et al.*, 1992). Jedes Gen besteht aus den Transkriptions-Start- und Stop-Signalen, 3'- und 5'-nicht-translatierten Bereichen sowie dem offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) (Feldmann *et al.*, 1992; Mühlberger *et al.*, 1996). Die Gene von MARV VP30 und VP24 (Abbildung 4C), sowie von EBOV VP35 und VP40, von GP und VP30 sowie von VP24 und L überlappen zudem (Mühlberger, 2007).

Das Genom enthält daneben einen Leader-Bereich am 3'-Beginn und einen Trailer-Bereich am 5'-Ende des Genoms, die Signale für die Regulation von Transkription, Replikation und Verpackung beinhalten (Kiley *et al.*, 1986; Feldmann *et al.*, 1992; Volchkov *et al.*, 1999; Enterlein *et al.*, 2009). Die virale RNA bildet zusammen mit den Proteinen NP, VP30, VP35 und der Polymerase L die Nukleokapside, an denen auch VP24 beteiligt ist (Abbildung 4) (Becker *et al.*, 1998; Becker and Mühlberger, 1999; Bharat *et al.*, 2011, 2012; Wan *et al.*, 2017). Dieser Komplex wird umgeben vom viralen Matrixprotein VP40, welches die Verbindung zur viralen Lipidmembran herstellt (Bharat *et al.*, 2011, 2012). In die Membran eingelagert ist das einzige Oberflächenprotein der Filoviren, das Glykoprotein, welches für den Eintritt in die Wirtszelle eine wichtige Rolle spielt (Becker, Klenk and Mühlberger, 1996).

1.1.5. Virale Proteine

1.1.5.1. NP

Das Nukleoprotein NP ist Teil der Nukleokapside, umhüllt die virale RNA und ist essentiell für die virale Transkription und Replikation (Becker *et al.*, 1998; Mühlberger *et al.*, 1998, 1999; Wenigenrath *et al.*, 2010). Es lagert sich bereits in Abwesenheit der übrigen viralen Proteine zu helikalen, tubulären Strukturen zusammen und spielt eine wichtige Rolle für die Struktur und die Ausbildung der Nukleokapside, sowie der finalen Viruspartikel (Kolesnikova *et al.*, 2000; Mavrakis *et al.*, 2002; Bharat *et al.*, 2011, 2012; Wan *et al.*, 2017).

In der Zelle führt es zur Ausbildung von Einschlusskörpern, die Ort der viralen Transkription und Replikation sind (Kolesnikova *et al.*, 2000; Dolnik *et al.*, 2015). NP interagiert mit VP35 und VP30 und rekrutiert diese in die viralen Einschlusskörper (Becker *et al.*, 1998; Kirchdoerfer *et al.*, 2016). Auch mit VP24 zeigt es eine Interaktion und rekrutiert es in Einschlusskörper (Bamberg *et al.*, 2005; Bharat *et al.*, 2011, 2012; Banadyga *et al.*, 2017). NP besitzt zwei Doppelhelices (*coiled coil*), die wichtig sind für die Homooligomerisierung und Interaktion mit VP35 (DiCarlo *et al.*, 2007). Außerdem interagiert NP mit VP40, welches eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Nukleokapsiden an die Plasmamembran spielt (Dolnik *et al.*, 2010, 2014; Wenigenrath *et al.*, 2010). Über ein PSAP Late-Domain Motiv im C-Terminus rekrutiert NP zudem Tsg101 zu VP40-positiven Knospungsstellen (*budding sites*) und verstärkt so die Freisetzung von Viruspartikeln (Dolnik *et al.*, 2010, 2014). NP besitzt außerdem mehrere Phosphorylierungsstellen und kann in der Zelle sowohl phosphoryliert als auch nicht phosphoryliert vorliegen, wobei nur die phosphorylierte Form in Nukleokapside eingebaut wird (Becker *et al.*, 1994; Lötfering *et al.*, 1999). Zudem scheint die Phosphorylierung eine wichtige Rolle in der Modulierung von Transkription und Replikation zu spielen (DiCarlo *et al.*, 2007).

1.1.5.2. VP35

VP35 bildet als Kofaktor zusammen mit der Polymerase L den Komplex der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und ist essentiell für die virale Transkription und Replikation (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999). Es interagiert mit L, sowie mit dem Nukleoprotein und vermittelt so die Interaktion zwischen der Polymerase und den Nukleokapsiden, als Voraussetzung für Transkription und Replikation (Becker *et al.*, 1998; Mühlberger *et al.*, 1998, 1999). VP35 bildet Homooligomere über Doppelhelices im N-Terminus, wobei die Oligomerisierung Voraussetzung für die Interaktion mit der Polymerase L ist (Möller *et al.*, 2005). VP35 entspricht dem Phosphoprotein (P-Protein) der übrigen Mononegavirales. Im Gegensatz zu diesen liegt es jedoch nicht oder nur schwach phosphoryliert vor (Becker and Mühlberger, 1999).

Neben seiner Funktion als Kofaktor der Polymerase spielt VP35 eine bedeutende Rolle in der Hemmung der angeborenen Immunabwehr (Basler *et al.*, 2000; Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015). VP35 bindet über seine C-terminale Interferon Inhibierende Domäne (*interferone inhibitory domain*, IID) Doppelstrang-RNA (dsRNA) in der Zelle und verhindert so deren Erkennung durch zelluläre Sensoren, wie RIG-I und MDA-5 (Abbildung 5) (Hartman, Towner and Nichol, 2004; Cárdenas *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2009).

Das RIG-I aktivierende Protein PACT wird durch VP35 in seiner Funktion gestört (Abbildung 5) (Luthra *et al.*, 2013). VP35 verhindert die Phosphorylierung und Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 und dadurch die weitere Aktivierung der Interferon-Synthese (Abbildung 5) (Basler *et al.*, 2000, 2003; Chang *et al.*, 2009). Dabei wurde gezeigt, dass VP35 mittels PIAS1 IRF-7 sumoyliert und inaktiviert (Kubota *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009).

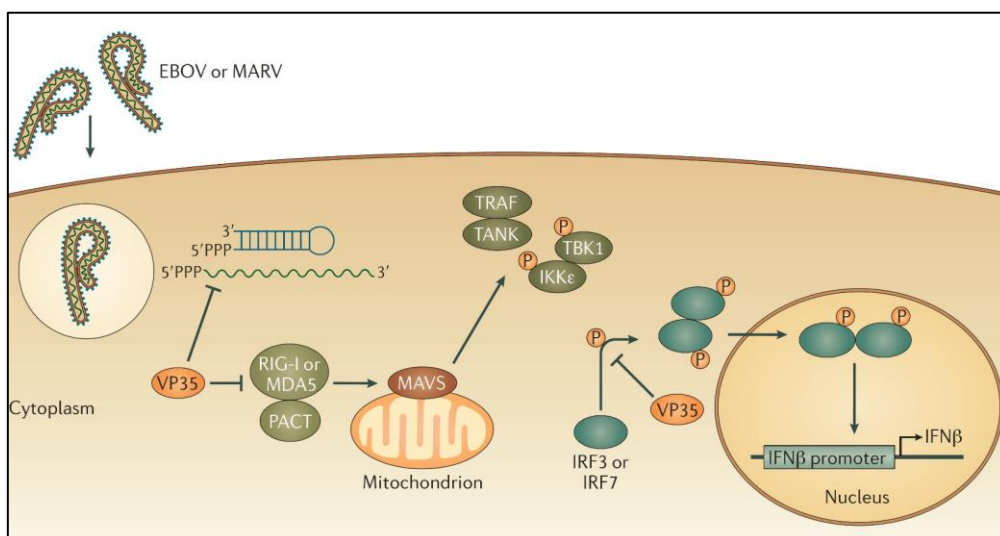


Abbildung 5: MARV und EBOV VP35 hemmen die Interferon Induktion, verändert nach (Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015).

Auch die IRF-3 aktivierenden Kinasen IKK ϵ und TBK-1 werden durch VP35 inhibiert (Abbildung 5) (Prins, Cardenas and Basler, 2009). Zudem ist es in der Lage die interferon-aktivierte antivirale Protein-Kinase R (PKR) zu inhibieren (Feng *et al.*, 2007; Schumann, Gantke and Muhlberger, 2009).

Außerdem beeinträchtigt es die Reifung von dendritischen Zellen, damit die Aktivierung von T-Zellen und schließlich die Ausbildung einer effizienten adaptiven Immunantwort (Bosio *et al.*, 2003; Geisbert *et al.*, 2003; Mahanty *et al.*, 2003; Lubaki *et al.*, 2013, 2016; Yen *et al.*, 2014).

1.1.5.3. VP40

VP40 stellt das Matrixprotein der Filoviren dar und bildet die Verbindung zwischen den Nukleokapsiden und der äußeren Lipidhülle indem es die Innenseite der viralen Membran auskleidet (Abbildung 4) (Kolesnikova *et al.*, 2002; Bharat *et al.*, 2011, 2012). Nach seiner Synthese assoziiert es mit zellulären Membranen und ist in *multivesicular bodies* (MVBs) zu finden (Kolesnikova *et al.*, 2002, 2004). Es spielt eine wichtige Rolle in der Umverteilung von Nukleokapsiden zur Plasmamembran, der Rekrutierung von GP an die Membran sowie bei der Ausbildung und Freisetzung neuer Viruspartikel (Dolnik *et al.*, 2010, 2014; Brauburger *et al.*, 2012; Kolesnikova *et al.*, 2012). Die Einzeldexpression von VP40 führt zur Bildung und Freisetzung von VLPs, wobei diese in Gegenwart von GP oder NP noch verstärkt ist (Noda *et al.*, 2002; Kolesnikova *et al.*, 2004, 2009; Licata *et al.*, 2004; Swenson *et al.*, 2004; Wenigenrath *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2017). VP40 oligomerisiert, wobei für EBOV VP40 eine Ausbildung von Dimeren, Hexameren und Octameren gezeigt werden konnte (Gomis-Rüth *et al.*, 2003; Timmins *et al.*, 2003; Hoenen *et al.*, 2005). Oligomeres VP40 bildet höhere Strukturen in Form von Ringen aus, die wiederum Stab-förmige tubuläre Strukturen bilden (Gomis-Rüth *et al.*, 2003; Timmins *et al.*, 2003). MARV VP40 wird am N-Terminus phosphoryliert (Kolesnikova *et al.*, 2012). Diese Phosphorylierung stellt eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung von Nukleokapsiden zur Plasmamembran dar. Außerdem besitzt VP40 ein PPPY Late-Domain Motiv, dass eine wichtige Rolle für die Interaktion mit dem ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complexes required for transport*) spielt, darunter Tsg101 und Nedd4, welche beide wichtig für die Freisetzung von Virus-Partikeln sind (Urata *et al.*, 2007; Kolesnikova *et al.*, 2009; Dolnik *et al.*, 2010, 2014; Urata and Yasuda, 2010).

MARV VP40 spielt zudem eine wichtige Rolle als Antagonist der angeborenen antiviralen Immunantwort. Es verhindert die Phosphorylierung der Janus-Kinase Jak1 und blockiert dadurch den JAK-STAT Signalweg und die Interferon-Signalkaskade (Abbildung 6) (Valmas *et al.*, 2010; Valmas and Basler, 2011; Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015).

1.1.5.4. GP

Das Glykoprotein GP, das einzige Oberflächenprotein der Filoviren, vermittelt die Anlagerung und den Eintritt der Viren in die Wirtszelle (Will *et al.*, 1993; Becker, Klenk and Mühlberger, 1996). Bei GP handelt es sich um ein Typ-1-Transmembranprotein, das als Homotrimer in die Lipidhülle der Viren eingelagert ist (Feldmann *et al.*, 1991; Brauburger *et al.*, 2012). EBOV und MARV GP unterscheiden sich in Hinsicht auf den offenen Leserahmen. Während MARV GP als ein offener Leserahmen vorliegt, codiert EBOV mittels transkriptioneller Editierung neben dem membrangebundenen GP für zwei weitere Nicht-Strukturproteine von GP, *soluble GP* (sGP) und *small soluble GP* (ssGP), (Volchkov *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1996; Volchkova *et al.*, 1998; M. Mehedi *et al.*, 2011; Mohan *et al.*, 2012).

Die Synthese von GP erfolgt als Vorläuferprotein *precursor GP* (preGP) im endoplasmatischen Retikulum. preGP wird anschließend über den klassischen sekretorischen Weg über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Auf dieser Route wird es mit einer Reihe posttranslationaler Modifikationen versehen, wie Glykosylierungen (Feldmann *et al.*, 1991; Becker, Klenk and Mühlberger, 1996), Phosphorylierungen (Sänger *et al.*, 2002), und Acylierungen (Funke *et al.*, 1995). Dabei wird GP sowohl mit N-Glykanen des Mannose-Typs als auch mit O-Glykanen des Mucin-Typs modifiziert, wobei die Glykosylierungen einen erheblichen Teil des Molekulargewichtes ausmachen (Geyer *et al.*, 1992; Feldmann *et al.*, 1994). Außerdem erfolgt innerhalb des Trans-Golgi-Netzwerks eine Abspaltung des Signalpeptids und eine Spaltung von GP in GP1 und GP2, die über eine Disulfid-Brücke verbunden sind, wobei GP1 die Ektodomäne darstellt, während GP2 die Transmembrandomäne beinhaltet (Brauburger *et al.*, 2012). GP1 vermittelt die Bindung von Eintrittsfaktoren und Rezeptoren und GP2 vermittelt die Fusion von Virusmembran und Wirtszellmembran. Im Fall von MARV GP stellt die proteolytische Aktivierung von GP1 eine wichtige Voraussetzung für die Bindung des Eintrittsfaktors Niemann-Pick C1 dar (Carette *et al.*, 2011; Côté *et al.*, 2011).

Neben seiner Funktion während des Viruseintritts fungiert GP auch als Antagonist der angeborenen Immunabwehr. So konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von VP40-VLPs durch Tetherin blockiert wird. GP wiederum verhindert eine solche Tetherin-bedingte Blockade der Freisetzung (Neil *et al.*, 2007; Jouvenet *et al.*, 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein immunsuppressives Motiv in GP2 in der Lage ist, eine Apoptose von Lymphozyten und eine Deregulierung der Zytokin-Expression herbeizuführen (Bukreyev *et al.*, 1993; Yaddanapudi *et al.*, 2006).

1.1.5.5. VP30

Bei VP30 handelt es sich um einen filoviralen Transkriptionsfaktor. MARV und EBOV VP30 zeigen viele strukturelle Gemeinsamkeiten und eine Identität von etwa 34% der Aminosäuresequenz. So besitzen sie N-terminal gelegene Serine und Threonine, die als Phosphorylierungsstellen dienen (Modrof *et al.*, 2001, 2002). Außerdem verfügen Sie über ein Zink-Finger-Motiv (Modrof, Becker and Mühlberger, 2003) und ein Tetra-Leucin-Motiv (Hartlieb *et al.*, 2003), das als Homooligomerisierungsdomäne dient. C-terminal zeigt VP30 ein weiteres Motiv, das für die Dimerisierung und Bindung des Nukleoproteins NP wichtig ist (Hartlieb *et al.*, 2007; Kirchdoerfer *et al.*, 2016). VP30 hat keine Entsprechung innerhalb der Mononegavirales. Lediglich die Vertreter der *Pneumoviridae* besitzen ein Protein das VP30 ähnelt, das M2-1 Protein, welches als Elongations-, Prozessivitäts- und Antiterminationsfaktor wirkt (Collins *et al.*, 1996).

Während EBOV VP30 essentiell für die virale Transkription ist, kann diese bei MARV auch in Abwesenheit von VP30 ablaufen (Becker *et al.*, 1998; Mühlberger *et al.*, 1998, 1999; Modrof *et al.*, 2002; Wenigenrath *et al.*, 2010).

Für EBOV konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von VP30 eine wichtige Rolle beim Umschalten von Transkription zu Replikation spielt (Biedenkopf *et al.*, 2013; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016; Lier, Becker and Biedenkopf, 2017; Kruse *et al.*, 2018), dass VP30 über den Zink-Finger an einzelsträngige RNA bindet (Biedenkopf *et al.*, 2016; Schlereth *et al.*, 2016) und dass VP30 RNA-abhängig mit VP35 und L interagiert (Groseth *et al.*, 2009; Biedenkopf *et al.*, 2016). Außerdem wurde gezeigt, dass EBOV VP30 eine wichtige Rolle beim Start der Transkription zukommt, indem es als Transkriptionsinitiationsfaktor hilft RNA-Sekundärstrukturen am Transkriptionsstart zu überwinden (Weik *et al.*, 2002; Modrof, Becker and Mühlberger, 2003; Martínez *et al.*, 2008).

Für MARV VP30 existieren hierzu bislang keine Daten. Die Bereiche der Phosphorylierungsstellen, des Zink-Fingers, der Homooligomerisierungsdomäne und der NP-Bindung sind jedoch bei MARV konserviert, sodass Sie möglicherweise ähnliche Funktionen übernehmen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Transkription bei MARV zwar in Abwesenheit von VP30 abläuft (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999), VP30 diese jedoch wesentlich verstärkt (Wenigenrath *et al.*, 2010) und eine Herstellung von rekombinantem MARV (Rescue) nur in Gegenwart von VP30 erfolgreich ist (Enterlein *et al.*, 2006). Eine Herunterregulierung von VP30 mittels RNA-Interferenz führt zudem zu einer reduzierten viralen Proteinexpression und reduzierter Freisetzung von Viruspartikeln (Fowler *et al.*, 2005).

1.1.5.6. VP24

Das virale Protein VP24 ist einzigartig für die Filoviren. Lange Zeit wurde VP24 als zweites Matrixprotein neben VP40 angesehen, da es zusammen mit diesem in den Bereich zwischen Nukleokapsiden und Lipidhülle eingelagert ist (Brauburger *et al.*, 2012). Untersuchungen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie zeigten jedoch, dass es ebenfalls Teil der Nukleokapside ist (Bharat *et al.*, 2011, 2012; Wan *et al.*, 2017). Es liegt als Oligomer und dabei meist als Tetramer vor (Bamberg *et al.*, 2005).

VP24 findet sich in der Zelle zu einem geringen Teil membranassoziiert, in NP-induzierten Einschlusskörpern, aber auch diffus im Zytoplasma und gebunden an Nukleokapside (Bamberg *et al.*, 2005; Brauburger *et al.*, 2012). VP24 scheint dabei während der Infektion an der Reifung von Nukleokapsiden und der Interaktion von Nukleokapsiden mit der Zellmembran in Vorbereitung auf die Virusfreisetzung beteiligt zu sein (Bamberg *et al.*, 2005; Brauburger *et al.*, 2012). Außerdem beeinflusst die Menge an VP24 die Transkription und Replikation (Wenigenrath *et al.*, 2010).

Für EBOV VP24 wurde neben diesen Funktionen auch eine Rolle als Antagonist der angeborenen Immunabwehr beschrieben (Abbildung 6).

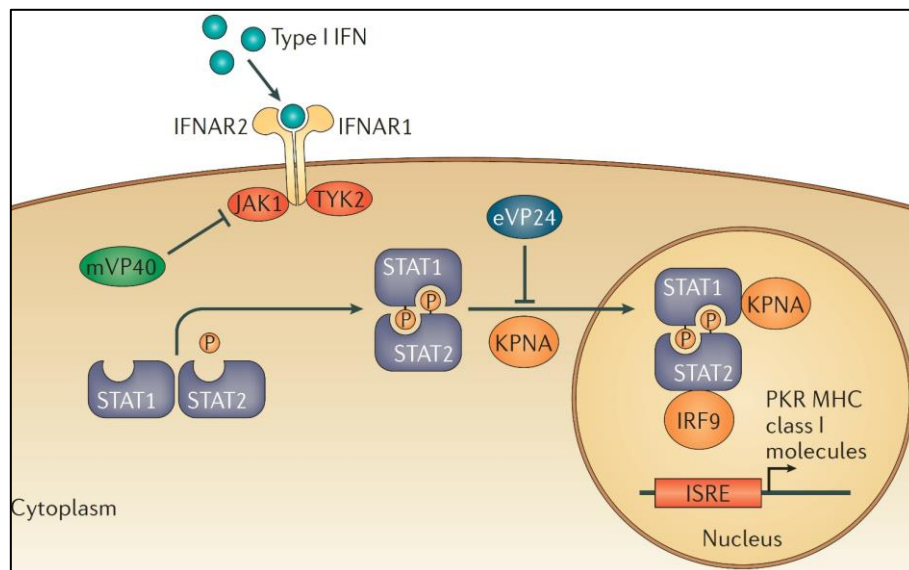


Abbildung 6: EBOV VP24 und MARV VP40 hemmen die Interferon Signalkaskade, verändert nach (Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015).

Dabei verhindert EBOV VP24 den Eintritt von phosphorylierten und damit aktivierten STAT-Dimeren in den Zellkern (Abbildung 6) (Reid *et al.*, 2006, 2007; Mateo *et al.*, 2010; Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015). Auf diese Weise wird der JAK-STAT Signalweg blockiert und die Synthese von Interferon verhindert. Außerdem interagiert MARV VP24 mit KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) und aktiviert dadurch Nrf2-vermittelte zytoprotektive Antworten (Edwards *et al.*, 2014).

1.1.5.7. L

Die Polymerase L bildet zusammen mit dem Kofaktor VP35 die RNA-abhängige RNA Polymerase der Filoviren, die essentiell für die virale Transkription und Replikation ist (Mühlberger *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1998; Wenigenrath *et al.*, 2010). Dabei enthält L die enzymatischen Funktionen der Polymerase, während VP35 die Interaktion mit der viralen RNA vermittelt, wobei die Interaktion zwischen L und VP35 über den N-Terminus von L erfolgt (Mühlberger *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1998; Brauburger *et al.*, 2012; Trunschke *et al.*, 2013).

Innerhalb der Mononegavirales sind die Polymerasen auf Aminosäureebene hoch konserviert (Poch *et al.*, 1990). Daher wird angenommen, dass die Polymerase L für RNA Synthese, *Capping* und Polyadenylierung verantwortlich ist (Brauburger *et al.*, 2012). Als katalytisches Zentrum für EBOV L konnte ein GDNQ-Motiv identifiziert werden, dass auch in den übrigen Filoviren konserviert ist (Schmidt and Hoenen, 2017). Außerdem konnte eine Interaktion von EBOV L mit der DNA-Topoisomerase 1 gezeigt werden (Takahashi *et al.*, 2013).

1.1.6. Filoviraler Replikationszyklus

Der filovirale Replikationszyklus lässt sich in verschiedene Abschnitte unterteilen:

- I. Adsorption, Eintritt, Fusion
- II. Transkription und Replikation
- III. Assemblierung und Freisetzung

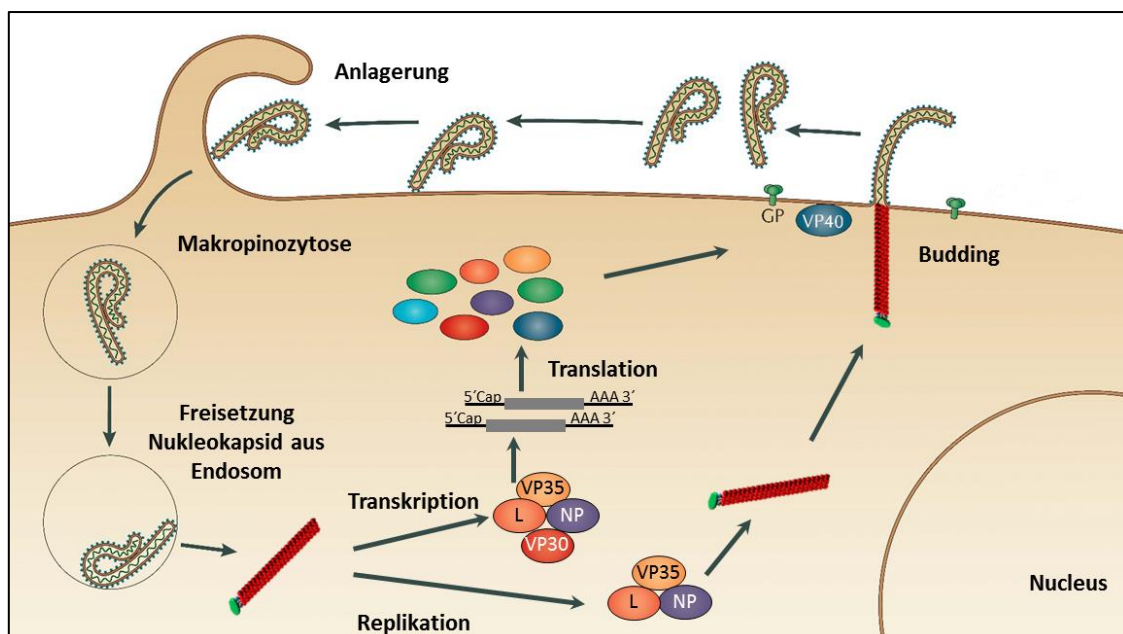


Abbildung 7: Filoviraler Replikationszyklus, verändert nach (Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015).

1.1.6.1. Adsorption, Eintritt und Fusion

Der Replikationszyklus beginnt mit der Anlagerung und dem Eindringen von Viren in die Zielzellen (Abbildung 7A). Es wurde eine Vielzahl von Rezeptoren beschrieben, wobei diese sich zum Teil je nach Zelltyp unterscheiden. Das Glykoprotein GP vermittelt die Anlagerung und den Eintritt in die Zelle. Die Bindung erfolgt über Kohlenhydrate von GP an verschiedene Rezeptoren, wie C-Typ Lektine (Brauburger *et al.*, 2012), darunter ASGP-R (Becker, Spiess and Klenk, 1995), DC-SIGN, DC-SIGNR (Marzi *et al.*, 2007), hMGL (Matsuno *et al.*, 2010), LSECTin (Gramberg *et al.*, 2005). Weitere mögliche Rezeptoren sind Axl, Dtk, Mer (Shimojima *et al.*, 2006) und TIM-1 (Kondratowicz *et al.*, 2011). Die Rezeptoren sind zum Teil zelltypspezifisch, wie z. B. ASPG-R auf Hepatozyten (Becker, Spiess and Klenk, 1995). Die Infektion von Zellen in Abwesenheit bestimmter Rezeptoren deutet dabei auf eine funktionelle Redundanz hin (Brauburger *et al.*, 2012).

Im nächsten Schritt erfolgt die Endozytose der Viren und damit der Viruseintritt (Abbildung 7B). Für EBOV konnte mittels VLPs und Virus gezeigt werden, dass die Makropinozytose hier eine wichtige Rolle spielt (Nanbo *et al.*, 2010; Saeed *et al.*, 2010; Aleksandrowicz *et al.*, 2011). Zwar wurde dies nicht für MARV gezeigt, aufgrund der ähnlichen Morphologie der filamentösen Viren liegt es jedoch nahe, dass Sie auch für MARV wichtig ist (Brauburger *et al.*, 2012).

Die endozytierten Virus-Partikel gelangen in das Endosom, wo eine Ansäuerung erfolgt und es zur proteolytischen Spaltung des GP1 kommt (Misasi *et al.*, 2012). GP1 bindet an den Rezeptor Niemann-Pick C1 und vermittelt durch GP2 kommt es zur Fusion von Virusmembran und Zellmembran und zur Freisetzung der Viren in das Zytoplasma (Abbildung 7C) (Weissenhorn *et al.*, 1998; Carette *et al.*, 2011; Côté *et al.*, 2011; Koellhoffer *et al.*, 2012).

1.1.6.2. Transkription und Replikation

Im nächsten Schritt erfolgt die primäre Transkription der viralen RNA in mRNAs (Abbildung 7D) und nachfolgend deren Translation in Proteine (Abbildung 7E). Die von NP enkapsidierte virale RNA wird vom viralen Polymerasekomplex bestehend aus L und VP35 in mRNAs transkribiert (Abbildung 7D) (Becker *et al.*, 1998; Mühlberger *et al.*, 1998, 1999), wobei VP30 eine wichtige Rolle spielt. VP30 ist bei EBOV essentiell für die Transkriptionsinitiation (Modrof *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2008) und steigert bei MARV die Transkription erheblich (Mühlberger *et al.*, 1999; Wenigenrath *et al.*, 2010). Dabei erhalten die mRNAs ein 5'-Cap und werden am 3'-Ende-polyadenyliert (Brauburger *et al.*, 2012). Anschließend erfolgt die Translation durch den zellulären Translationsapparat (Abbildung 7E). Die ersten viralen Proteine können etwa 12 Stunden nach Infektion im Zytoplasma der infizierten Zellen detektiert werden (Brauburger *et al.*, 2012).

Für EBOV konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von VP30 das Umschalten von Transkription zu Replikation reguliert (Biedenkopf, Lier and Becker, 2016), VP30 für die Replikation jedoch nicht notwendig ist (Abbildung 7F). Der Polymerase-Komplex aus L und VP35 erzeugt eine antigenomische Positiv-Strang RNA, die ebenfalls durch NP enkapsidiert ist und der Erzeugung neuer Virusgenome dient. (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999).

Im Zytoplasma der Zelle entstehen Einschlusskörper in denen im weiteren Verlauf tubuläre Strukturen beobachtet werden können, bei denen es sich um neugebildete Nukleokapside handelt (Becker *et al.*, 1998; Kolesnikova *et al.*, 2000; Dolnik *et al.*, 2015). Dabei wurde für EBOV gezeigt, dass die virale Transkription bereits vor Ausbildung der Einschlusskörper, d. h. außerhalb von diesen abläuft, während die Replikation im inneren der Einschlusskörper stattfindet (Hoenen *et al.*, 2012). Andere Studien legen jedoch Nahe, dass die Transkription auch in Einschlusskörpern stattfindet (Martinez *et al.*, 2011; Biedenkopf *et al.*, 2013; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016; Lier, Becker and Biedenkopf, 2017).

1.1.6.3. Assemblierung und Freisetzung

Die neugebildeten Nukleokapside, bestehend aus dem viralen Genom, NP, VP35, VP30 und L werden von den Einschlusskörpern zur Zellperipherie transportiert. Wie vor kurzem gezeigt werden konnte, erfolgt dieser Transport Aktin-abhängig (Schudt *et al.*, 2013, 2015). Des Weiteren sind die viralen Proteine NP, VP35 und VP24 notwendig, um den Transport von Nukleokapsiden zu ermöglichen, was die Vermutung nahe legt, dass diese eine wichtige Rolle im Transport spielen (Takamatsu, Kolesnikova and Becker, 2018). GP wird über das ER und den Golgi-Apparat ebenfalls zur Zellmembran transportiert, wo es in diese eingelagert vorliegt. VP40 akkumuliert dabei an MVBs und der Plasmamembran, wohin es GP und Nukleokapside rekrutiert und die Freisetzung induziert (Abbildung 7G) (Brauburger *et al.*, 2012). An der Freisetzung sind auch zelluläre Proteine des ESCRT-Komplexes beteiligt, wie Tsg101, VPS4 und Nedd4 (Urata *et al.*, 2007; Kolesnikova *et al.*, 2009; Dolnik *et al.*, 2010, 2014; Urata and Yasuda, 2010). Die Freisetzung an der Plasmamembran erfolgt bevorzugt an Filopodien (Abbildung 7G) (Kolesnikova *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um filamentöse, zelluläre Fortsätze, die der Zelle zur Wahrnehmung und Kontaktaufnahme zu anderen Zellen dienen. Die Knospung und Freisetzung der Viruspartikel erfolgt durch eine seitliche Anlagerung der Nukleokapside an die Plasmamembran, wobei das Nukleokapsid mit der Membran umhüllt wird, bevor es vertikal aus dem Filopodium freigesetzt wird. (Welsch *et al.*, 2010).

1.2. PIAS-Proteine

Die *Protein inhibitor of activated STAT*-Proteine (PIAS) wurden als negative Regulatoren des JAK-STAT-Signalweges identifiziert (Chung *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Shuai and Liu, 2005). Die Familie der PIAS-Proteine besteht aus 4 Proteinen, PIAS1, PIAS2 (auch bekannt als PIASx), PIAS3 und PIAS4 (auch bekannt als PIASy) (Shuai and Liu, 2005). Für jedes PIAS Protein, außer PIAS1, existieren zwei Isoformen. Neben der Bedeutung in der JAK-STAT Signalkaskade wurde auch gezeigt, dass es sich bei den PIAS-Proteinen um E3-Sumo-Ligasen handelt, die in der Lage sind andere Proteine zu sumoylieren (Jackson, 2001; Schmidt and Müller, 2003). Eine Vielzahl von Proteinen, die meisten davon Transkriptionsfaktoren, können von den PIAS-Proteinen auf unterschiedliche Weise, positiv oder negativ reguliert werden. Die PIAS-Proteine sind vor allem im Zellkern lokalisiert (Miyauchi *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

1.2.1. Aufbau der PIAS-Proteine

Die Familie der PIAS-Proteine zeigt eine Sequenz-Identität auf Proteinebene von 40% und eine konservierte Domänenstruktur (Abbildung 8) (Liu *et al.*, 1998; Shuai and Liu, 2005).

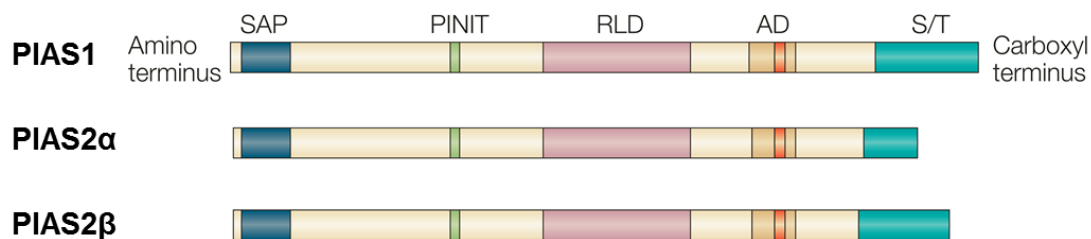


Abbildung 8: Domänenstruktur der PIAS-Proteine PIAS1 und PIAS2, modifiziert nach Shuai *et al.* (Shuai and Liu, 2005).

Die meisten PIAS-Proteine haben 5 konservierte Domänen: **SAP** Domäne (*scaffold-attachment factor A (SAFA) and SAFB, apoptotic chromatin-condensation inducer in the nucleus (ACINUS) and PIAS domain*), enthält konserviertes LXXLL Motiv. **PINIT**-Aminosäuremotiv. **RLD**-Motiv (*RING-finger-like zinc-binding domain*). **AD** (*highly acidic domain*) enthält SUMO1-Interaktionsmotiv (rot). **S/T** Region enthält hohen Anteil an Serin/Threonin.

Die SAP-Domäne (*scaffold-attachment factor A, [SAFA] and SAFB, apoptotic chromatin-condensation inducer in the nucleus [ACINUS] and PIAS domain*) kann Adenin- und Thymin-reiche DNA binden. Das Kerngerüst besteht zu einem großen Anteil aus Adenin- und Thymin-reicher DNA und so könnte die SAP-Domäne der Anheftung an das Kerngerüst dienen (Shuai and Liu, 2005). Die SAP-Domäne enthält ein LXXLL Aminosäuremotiv, das Interaktionen zwischen Kernrezeptoren und Koregulatoren vermittelt. Das PINIT-Aminosäuremotiv ist beteiligt an der Kernretention der PIAS-Proteine (Duval *et al.*, 2003). Bei der RLD-Domäne handelt es sich um eine RING-Finger-ähnliche Zink-bindende Domäne (*Ring-finger-like zinc binding domain*, RLD),

welche die E3-SUMO-Ligase Funktion der PIAS-Proteine erfüllt (Kotaja *et al.*, 2002). Der C-Terminus der PIAS-Proteine enthält eine stark saure AD Domäne (*Acidic domain*, AD) und eine Serin-Threonin-Reiche S/T Domäne, deren Funktionen bislang unklar sind.

1.2.2. Wirkung der PIAS-Proteine als E3-SUMO-Ligasen

Die PIAS-Proteine wirken unter anderem als E3-SUMO-Ligasen. Einen guten Überblick über Funktion, Regulation und Erkrankungen, bei denen Sumoylierungen eine Rolle spielen sowie beteiligte Viruserkrankungen geben Wilson und Lowrey. (Lowrey, Cramblet and Bentz, 2017; Wilson, 2017). Sumoylierung ist ein Prozess der post-translationalen Modifikation, zu denen auch Glykosylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Acetylierung und Methylierung zählen (Lowrey, Cramblet and Bentz, 2017). Das SUMO-Protein (*Small Ubiquitin-like modifier*) wurde 1997 identifiziert (Mahajan *et al.*, 1997). In der folgenden Zeit wurden vier unterschiedliche SUMO-Proteine identifiziert (SUMO-1-4), wobei SUMO-2 und SUMO-3 eine Homologie von 97% haben und daher oft zusammengefasst werden zu SUMO2/3 (Lowrey, Cramblet and Bentz, 2017). SUMO-1 und SUMO2/3 sind im ganzen Körper zu finden, während SUMO-4 vor allem in Makrophagen, Dendritischen Zellen und in den Nieren zu finden ist (Bohren *et al.*, 2004).

Der Prozess der Sumoylierung besteht aus drei Teilschritten (Abbildung 9), der Aktivierung, Konjugation und Ligation, die jeweils von einem spezifischen Enzym E1, E2 und E3 katalysiert werden (Shuai and Liu, 2005; Lowrey, Cramblet and Bentz, 2017; Wilson, 2017).

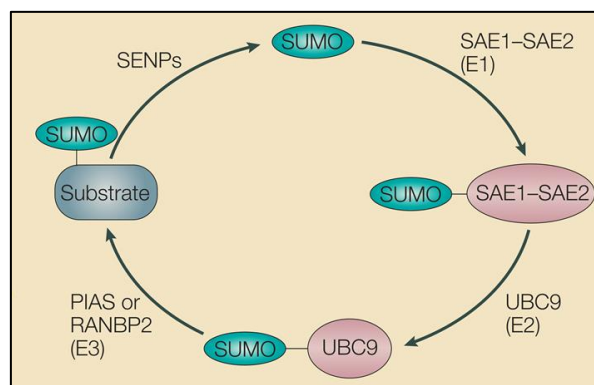


Abbildung 9: Enzymatische Schritte der Sumoylierung (Shuai and Liu, 2005).

E1: SUMO-aktivierende Enzyme (*SUMO activating enzyme*, SAE1-SAE2), ATP-vermittelte Aktivierung des SUMOs. E2: SUMO-konjugierende Enzyme (*Ubiquitin-conjugating enzyme*, UBC9), dienen der Übertragung des SUMO. E3: SUMO-Ligasen (*Ran-binding protein 2*, RANBP2, PIAS) vermitteln den Transfer und die kovalente Bindung des SUMO an das Ziel-Substrat. SUMO-spezifische Proteasen (*Sentrin-specific proteases*, SENPs), spalten SUMO-Reste ab.

Nach der Translation und Reifung des SUMO-Proteins erfolgt die Aktivierung des SUMO-Proteins durch das SUMO E1 aktivierende Enzym (Abbildung 9), ein

Heterodimer aus SAE1 und SAE2 (*SUMO-activating enzyme, 1, 2*) (Lowrey, Cramblet and Bentz, 2017). Im nächsten Schritt wird das SUMO-Protein vom E1-Enzym auf das E2-Enzym übertragen, das SUMO-verbindende Enzym (*Ubiquitin-conjugating enzyme 9, UBC9*). Dieses Enzym identifiziert das spezifische SUMOylierungsmotiv des Zielproteins und katalysiert die Bildung einer Isopeptid-Bindung. In einigen Fällen ist für den Prozess der spezifischen Übertragung auf das Zielprotein ein E3-Enzym notwendig, eine E3-SUMO-Ligase, wie beispielsweise PIAS-Proteine oder RANBP2 (*Ran-binding protein 2*).

1.2.3. Regulationsmechanismen der PIAS-Proteine

PIAS-Proteine können auf vielfältige Weise eine große Zahl an Proteinen, in der Mehrzahl Transkriptionsfaktoren, positiv oder negativ regulieren. Sie können beispielsweise durch Blockade der DNA-Bindung eines Transkriptionsfaktors eine Hemmung herbeiführen, wie dies bei der Inhibition von STAT1 durch PIAS1 der Fall ist (Liu *et al.*, 1998; Shuai and Liu, 2005).

Des Weiteren können PIAS-Proteine Koregulatoren rekrutieren, wie z. B. Histon-Deacetylasen (HDAC), die eine Hemmung der Transkription herbeiführen. Bei HDACs handelt es sich um Chromatin-modifizierende Enzyme, die Acetyl-Gruppen von Lysinresten auf Histonen entfernen, wodurch die Transkription reduziert ist. Für PIAS2 wurde gezeigt, dass es mit HDAC3 interagiert und dass die PIAS2-abhängige Hemmung von STAT4 HDAC-abhängig ist und durch den HDAC-Inhibitor Trichostatin A verhindert werden kann (Tussié-Luna *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2003).

Eine weitere wichtige Form der Regulation besteht in der Sumoylierung von Proteinen durch PIAS (1.2.2). Diese kann negativen oder positiven Einfluss auf Transkriptionsfaktoren ausüben. So wurde z. B. eine Sumoylierungs-vermittelte Hemmung von NF- κ B (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*) durch PIAS3 gezeigt (Liu *et al.*, 2012). Eine PIAS4-vermittelte Sumoylierung von SMAD4 (*Mothers against decapentaplegic homolog 4*) führt hingegen zu einer Aktivierung der Transkription. (P. S. W. Lee *et al.*, 2003).

Daneben wurde gezeigt, dass PIAS-Proteine Koaktivatoren wie p300 oder CREB-bindendes Protein (CBP) rekrutieren und dadurch die Transkription steigern können. So steigert PIAS3 durch Rekrutierung von p300 oder CBP die Transkription von SMAD3 (Long *et al.*, 2004; Ledsaak *et al.*, 2016).

1.2.4. PIAS-Proteine in zellulären Signalwegen

PIAS-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation vieler zellulärer Prozesse. Die Signalwege JAK-STAT, SMAD, und NF- κ B stellen dabei ein Haupteinflussgebiet der PIAS-Proteine dar (Shuai and Liu, 2005). Bei den STAT-Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die durch Janus-Kinasen (JAK) phosphoryliert und damit aktiviert

werden. Im Anschluss bewirken Sie die Transkription STAT-abhängiger Gene im Zellkern. Für alle PIAS-Proteine konnte eine Hemmung von verschiedenen STAT-Proteinen gezeigt werden. So interagieren PIAS1 (Liu *et al.*, 1998) und PIAS4 (Liu *et al.*, 2001) mit STAT1, PIAS3 mit STAT3 (Chung *et al.*, 1997) und PIAS2 mit STAT4 (Arora *et al.*, 2003). Dies deutet auf eine gewisse Spezifität, aber möglicherweise auch Redundanz der PIAS-Proteine hin. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die PIAS-Proteine z.T. mechanistisch unterschiedlich wirken. Während PIAS1 durch Bindung an STAT1-Dimere deren Bindung an die DNA verhindert (Liu *et al.*, 1998), wirkt PIAS2 wahrscheinlich durch Rekrutierung eines Korepressors in Form einer Histon-Deacetylase auf STAT4 (Arora *et al.*, 2003). Dabei ist die Wirkung der PIAS-Proteine Zytokin-abhängig. So bindet PIAS1 nur an aktivierte und phosphorylierte STAT1-Dimere und verhindert deren Bindung an die DNA. PIAS1 hemmt Gene mit schwachem STAT-Promotor, sog. PIAS1-sensitive Genen, wie z. B. GBP1, CXCL9, CXCL10, während andere Gene wie IRF1, IRF7, und IFL204 nicht betroffen sind (Liu *et al.*, 2004; Shuai and Liu, 2005). In PIAS1 Knockout-Zellen zeigte sich bei gleicher Interferonmenge eine verstärkte antivirale Wirkung von Interferon, die zu reduzierten Virustitern führte (Liu *et al.*, 2004).

Neben dem STAT-Signalweg beeinflussen die PIAS-Proteine auch den NF- κ B und den SMAD Signalweg (Shuai and Liu, 2005). Bei NF- κ B handelt es sich um dimere Transkriptionsfaktoren, die durch verschiedene Signale wie TNF und IL1 aktiviert werden können. NF- κ B kann je nach Stimulus eine Vielzahl von Reaktionen auslösen, wie Entzündung, Apoptose oder antivirale und antibakterielle Antworten. Für PIAS1 wurde gezeigt, dass es an NF- κ B binden kann und in der Lage ist, einen Teil der NF- κ B Zielgene zu inhibieren (Liu *et al.*, 2005).

Auch der Signalweg von *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) wird von PIAS Proteinen beeinflusst (Shuai and Liu, 2005). TGF- β reguliert und kontrolliert über die Familie der SMAD-Proteine vielfältige zelluläre Aufgaben, wie Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Tumorentwicklung und Immunantworten. Für PIAS1, PIAS2 und PIAS3 wurde gezeigt, dass diese einen positiven Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von SMAD2 und SMAD3 haben (Shuai and Liu, 2005). PIAS1 und PIAS2 üben durch Sumoylierung und Stabilisierung von SMAD4 einen positiven Effekt auf dessen transkriptionelle Aktivität aus (Ohshima and Shimotohno, 2003; Liang *et al.*, 2004).

Neben den erwähnten Signalwegen beeinflussen PIAS-Proteine auch den Zellzyklus und die Apoptose von Zellen (Shuai and Liu, 2005). Beispielsweise reguliert PIAS1 die transkriptionelle Aktivität von p53 (Shuai and Liu, 2005).

1.2.5. PIAS-Proteine in Virusinfektionen

PIAS-Proteine spielen nicht nur eine wichtige Rolle in zellulären Signalwegen, sondern auch während Virusinfektionen (Shuai and Liu, 2005; Lowrey, Cramblet and Bentz, 2017). Es konnte eine Beteiligung bei Infektionen von RNA- wie auch von Retro- und DNA-Viren gezeigt werden.

1.2.5.1. RNA-Viren

Bei den Hantaviren Seoul- und Hantaan-Virus, wurde eine Interaktion des Nukleoproteins mit PIAS1 und PIAS2 beschrieben und eine verstärkte Sumoylierung des Nukleoproteins beobachtet (B.-H. Lee *et al.*, 2003). Die Bedeutung dieser Interaktion ist jedoch bislang nicht geklärt.

Für EBOV konnte gezeigt werden, dass VP35 mit PIAS1 interagiert und die Sumoylierung von IRF7 verstärkt, was zu einer reduzierten Interferon-Antwort führt (Chang *et al.*, 2009).

Für Influenza A Virus konnte gezeigt werden, dass PIAS1, PIAS2 und PIAS4 in der Lage sind, das virale Nukleoprotein zu sumoylieren (Han *et al.*, 2014). PIAS2 α interagiert mit dem Nukleoprotein und die ektopische Expression von PIAS2 α führt zu erhöhten Virustitern. Bei der Entwicklung einer Leberzirrhose durch Hepatitis-C-Viren (HCV) spielen die PIAS-Proteine ebenfalls eine Rolle (Bautista *et al.*, 2007; El-Saadany *et al.*, 2013). PIAS3 ist während einer HCV-Infektion hochreguliert und verantwortlich für eine verminderte Interferon-Synthese. (Stärkel *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2010). Für PIAS2 konnte hingegen gezeigt werden, dass es mit dem HCV Core Protein interagiert, dessen Sumoylierung und dadurch dessen Abbau verstärkt (Guo *et al.*, 2017).

1.2.5.2. Retroviren

Infektionen mit dem Humanen T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV), einem Retrovirus, führen zur Hochregulation von PIAS3 (Cheng *et al.*, 2004). PIAS4 interagiert zudem mit dem Kapsid Protein des Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV), einem weiteren Retrovirus und steigert dessen Sumoylierung (Yueh *et al.*, 2006). Fehlt diese, so ist die virale Replikation reduziert.

1.2.5.3. DNA-Viren

Das Humane Zytomegalievirus (HCMV), interagiert über die viralen Proteine IE1 und IE2 mit PIAS1 (J.-M. Lee *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2014). PIAS1 verstärkt die Sumoylierung des IE2 Proteins und damit dessen transaktivierende Wirkung. Für das Epstein-Barr Virus (EBV) wurde eine ähnliche Wirkung gezeigt. PIAS1, PIAS2 α und PIAS2 β interagieren mit dem EBV Protein Rta, sumoylieren dieses und verstärken dessen transaktivierende Wirkung (Chang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006). Vor kurzem wurde außerdem gezeigt, dass PIAS1 die lytische Replikation von EBV beschränkt und reguliert (Zhang, Lv and Li, 2017).

Bei dem Humanen Papillomavirus 11 (HPV 11), sowie bei dem bovinen Papillomavirus (BPV) wurde ebenfalls eine Interaktion des viralen Proteins E1 mit PIAS1, PIAS2 α und PIAS2 β und eine verstärkte Sumoylierung durch diese Proteine beobachtet (Rosas-Acosta *et al.*, 2005).

Für das Humane Parvovirus B19 wurde eine NS1-vermittelte Hochregulation von PIAS3 und eine verminderte Immunreaktion beobachtet. (Duechting *et al.*, 2008).

Im Falle des Herpes Simplex Virus 1 (HSV1) konnte eine Rekrutierung von PIAS2 β in virus-induzierte Foci beobachtet werden (Cuchet-Lourenço *et al.*, 2011). Zudem üben PIAS1 sowie PIAS4 antivirale Effekte auf die HSV1 Replikation aus (Brown *et al.*, 2016; Conn *et al.*, 2016).

Die PIAS-Proteine spielen zudem eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Leberzirrhose durch Hepatitis-B-Viren (HBV). PIAS1 ist dabei an einer Resistenzentwicklung gegenüber einer Behandlung mit Interferon beteiligt. (Christen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016).

1.3. SETDB1

Das *SET domain bifurcated 1*-Protein (SETDB1) stellt eine H3-K9-Histon Methyltransferase (HMT) dar, welche eine wichtige Rolle in der epigenetischen Regulation der Transkription spielt (Karanth *et al.*, 2017). Die Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 durch SETDB1 hat dabei repressive Effekte auf das Chromatin (Schultz *et al.*, 2002; Herz, Garruss and Shilatifard, 2013).

1.3.1. Aufbau

SETDB1 besitzt ein Molekulargewicht von etwa 143 kDa und verfügt über verschiedene konservierte Domänen (Abbildung 10), die für die Funktion eine wichtige Rolle spielen (Karanth *et al.*, 2017).



Abbildung 10: Domänenstruktur von SETDB1.

Tudor-1 Domäne und Tudor-2 Domäne. MBD-Domäne (Methylbindedomäne). SET-Domäne, bestehend aus Pre-SET, SET, und Post-SET-Domäne.

Die Pre-SET, die namensgebende gabelförmige SET-Domäne und die Post-SET-Domäne sind für die Histon-Methylierung verantwortlich, wobei die katalytische Aktivität durch die Pre- und Post-SET-Domäne vermittelt wird (Karanth *et al.*, 2017). Die Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD) ist beteiligt an der Stummschaltung des Chromatins. Die beiden Tudor-Domänen vermitteln Interaktionen mit Chromatin-modifizierenden Enzymen und Transkriptionsfaktoren.

SETDB1 vermittelt im Zellkern die Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 (Schultz *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen fanden SETDB1 hingegen hauptsächlich im Zytoplasma (Cho, Park and Kang, 2013). Hierbei spielt die Überexpression von SETDB1 und die enge Regulation des Zellkerneintritts von SETDB1 eine wichtige Rolle (Cho, Park and Kang, 2013). Auch ein Export von überschüssigem SETDB1 und Proteasom-vermittelter Abbau von SETDB1 scheinen für die vermehrte Detektion von SETDB1 im Zytoplasma verantwortlich zu sein (Cho, Park and Kang, 2013; Tachibana *et al.*, 2015)

1.3.2. Funktionen

SETDB1 ist verantwortlich für Histon-Methylierung, transkriptionelle Repression und das Stummschalten euchromatischer Gene (Schultz *et al.*, 2002; Ayyanathan *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Herz, Garruss and Shilatifard, 2013; Karanth *et al.*, 2017).

Die Histon-Methylierung spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Genexpression. Es sind fünf Histon-Methyltransferasen bekannt, die eine Modifikation von Histon H3 an Lysin 9 (H3K9) bewirken (Karanth *et al.*, 2017). Zwei dieser HMTs bewirken eine

Modifikation von heterochromatischen Bereichen (Aagaard *et al.*, 1999), d. h. von kondensiertem, transkriptionell inaktivem Chromatin. Im Gegensatz dazu bewirken drei HMTs eine Modifikation von euchromatischen Bereichen, also dem nicht-kondensierten transkriptionell aktiven Chromatin, darunter auch SETDB1 (Ogawa *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2002). Eine Monomethylierung an H3K9 bewirkt eine Genaktivierung, während SETDB1 eine Trimethylierung bewirkt die zur Genrepression führt (Barski *et al.*, 2007).

Eine Stummschaltung von Genen kann SETDB1 auf unterschiedliche Weise bewirken. Häufig interagiert es dabei mit weiteren Proteinen. Bei der Inaktivierung des X-Chromosoms sorgt eine Interaktion von ATF7IP mit MBD1 und SETDB1 für eine SETDB1-vermittelte Trimethylierung und Inaktivierung des X-Chromosoms (Minkovsky *et al.*, 2014). Des weiteren bildet SETDB1 einen Repressor-Komplex mit TRIM28 (KAP1) und KRAB Zinkfinger Proteinen aus und hemmt spezifisch die Transkription bestimmter Gene (Schultz *et al.*, 2002; Sripathy, Stevens and Schultz, 2006; Karanth *et al.*, 2017). Außerdem interagiert SETDB1 mit HDACs und Transkriptionskorepressoren und bildet Proteinkomplexe, die an transkriptionellen Stummschaltungsreaktionen beteiligt sind (Yang *et al.*, 2003). Mit MBD1 und MCAF bildet es ebenfalls einen transkriptionellen Repressorkomplex (Ichimura *et al.*, 2005).

SETDB1 ist darüber hinaus integraler Bestandteil von *promyelocytic leukemia protein nuclear bodies* (PML-NB). PML und SETDB1 stellen die wichtigsten Bestandteile von PML-NB dar (Cho, Park and Kang, 2011; Karanth *et al.*, 2017). SETDB1 vermittelt strukturelle Integrität der PML-NB und ist an der transkriptionellen Regulation innerhalb dieser beteiligt (Cho, Park and Kang, 2011). Eine erhöhte Expression von SETDB1 wurde bei unterschiedlichen Krebserkrankungen beobachtet, wie Melanomen, Lungenkrebs, hepatozellulären Karzinomen, Brustkrebs, Ovarialkarzinom. SETDB1 spielt zudem eine Rolle für das Fortschreiten der Erkrankung und die Ausbildung von Metastasen (Ceol *et al.*, 2011; Karanth *et al.*, 2017).

1.3.3. SETDB1 in Virusinfektionen

SETDB1 kann eine Rolle in Virusinfektionen spielen. Es wurde als Eintrittsfaktor für EBOV identifiziert (Carette *et al.*, 2011), jedoch nicht weiter charakterisiert. SETDB1 interagiert mit dem HPV Protein E8^AE2C (Ammermann *et al.*, 2008). SETDB1 interagiert mit dem HIV Protein Tat und führt zu dessen Methylierung. Diese hat einen hemmenden Einfluss auf die transaktivierende Wirkung von Tat und die LTR-abhängige Transkription (Van Duyne *et al.*, 2008; Nishitsuji *et al.*, 2015). SETDB1 wird zudem an provirale Elemente im Genom rekrutiert und vermittelt deren Repression (Matsui *et al.*, 2010; Rowe *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2015). Außerdem ist SETDB1 an der Latenz von HCMV beteiligt (Rauwel *et al.*, 2015).

1.4. Fragestellung dieser Arbeit

Filovirus-Infektionen führen zu schweren, häufig tödlich verlaufenden Erkrankungen im Menschen und nicht-menschlichen Primaten. Der EBOV-Ausbruch von 2014-2016 mit mehr als 28.000 Fällen und 11.000 Toten hat gezeigt, wie wichtig ein besseres Verständnis von Filovirus-Infektionen ist. Neben den Funktionen viraler Proteine sind vor allem Interaktionen von viralen Proteinen mit zellulären Proteinen und Signalkaskaden von Bedeutung, da diese potentielle Ziele für neue antivirale Medikamente darstellen, um solche Ausbrüche in Zukunft besser kontrollieren zu können.

Im filoviralen Replikationszyklus spielt das virale Protein VP30 als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle. Es ist zusammen mit der viralen Polymerase L, dem Polymerase Kofaktor VP35, und dem Nukleoprotein NP an der Transkription der viralen RNA beteiligt. Während bei MARV die Transkription eingeschränkt auch in Abwesenheit von VP30 abläuft, ist diese bei EBOV in Abwesenheit von VP30 fast vollständig inhibiert (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999). In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Arbeiten zeigen, dass EBOV VP30 entscheidend am Umschalten zwischen viraler Transkription und Replikation beteiligt ist (Biedenkopf *et al.*, 2013, 2016; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016; Lier, Becker and Biedenkopf, 2017).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue zelluläre Interaktionspartner des MARV VP30 mit Hilfe von Hefe-Zwei-Hybrid-Assays zu identifizieren und hinsichtlich ihrer Bedeutung für den viralen Replikationszyklus zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollte eine Einordnung der gefundenen Proteine hinsichtlich ihrer Bedeutung für den viralen Replikationszyklus und eine Klonierung der zugehörigen Gene erfolgen. Potentielle Interaktionen sollten in humanen Zellen bestätigt werden. In MARV Minigenom-Assays (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999; Wenigenrath *et al.*, 2010) sollte der Einfluss der gefundenen Proteine auf die Funktion von VP30 während der viralen Transkription und Replikation bestimmt werden. Ob gefundene Interaktionspartner auch für EBOV von Bedeutung sind, sollte abschließend in vergleichenden Analysen geklärt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen das Verständnis von Virus-Wirt-Interaktionen fördern und mögliche Netzwerke viraler Interaktionsmechanismen identifizieren, die für eine effiziente Virusreplikation notwendig sind. Dies kann zukünftig helfen MARV und EBOV Infektionen auf molekularer Ebene besser zu verstehen und langfristig neue Angriffspunkte für antivirale Medikamente aufzeigen.

2. Material

2.1. Chemikalien

Name	Hersteller
1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
3-Aminotriazol (3-AT)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Alcyan Blue	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Hercules (USA)
Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ (SO ₄)	Merck, Darmstadt (D)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg (D)
Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Aureobasidin A	Clontech, Mountain View (USA)
Bacto™-Agar	Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Bromphenolblau (BPB)	Roth, Karlsruhe (D)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Indianapolis (USA)
D(+)- Glucose	Merck, Darmstadt (D)
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriummethylenediamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure (HAc)	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol abs. (EtOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol vergällt (EtOH)	Fisher, Saarbrücken (D)
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim (D)
Fluorep	BioMérieux, Nürtingen (D)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe (D)
Hefe-Stickstoff-Basis (YNB) (ohne Aminosäuren, Difco™)	Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes (USA)
Isoleucin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe (D)
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Adenin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Glutamin 200 mM	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
L-Histidin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Leucin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (D)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	Merck, Darmstadt (D)
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Methionin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Biorad, Hercules (USA)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel-de-Haën, Seelze (D)
Nonidet P-40	Merck, Darmstadt (D)

Name	Hersteller
Nycodenz, gelöst in TNE	Axis-Shield, Oslo (N)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Pepton	Roth, Karlsruhe (D)
Phenylalanin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim (D)
Rotiphoress® Gel 30 (Polyacrylamid)	Roth, Karlsruhe (D)
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt (D)
Seakem LE Agarose	Lonza, Basel (Ch)
Sucrose	Serva, Heidelberg (D)
Threonin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
TransIT® LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tween® 20	neoLab®, Heidelberg (D)
Tyrosin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Uracil	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Valin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
X-α-Gal	Clontech, Mountain View (USA)
Y-PER™ Yeast Protein Extraktions Reagenz	Thermo Fisher, Waltham (USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.2. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
25 cm ² , 75 cm ² , Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
6, 12, 24 Well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
96 well Platten <i>LumiNunc</i> ™ weiß	Nunc, Roskilde (DK)
Blottingpapier <i>GB 002</i> (Whatman® 3 mm)	Whatman, Maidstone (UK)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Gewebekulturröhrchen (TC-Tube)	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
MicroAmp® Optical 8-Tube und Cap Strips, 0,2 ml	Applied Biosystems, Cheshire (UK)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Nalgene® 569-0020 Rapid-Flow™ Sterile Filter Unit 0.2 µm, 500 ml	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Nitrozellulose Transfer Membran <i>PROTRAN</i> ®, Ø 0,45 µm	Whatman, Maidstone (UK)
Objektträger 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha (USA)
PCR-Tubes, 0.2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml <i>Cellstar</i> ®	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen 0.1-1 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl <i>TipOne</i> ® (mit und ohne Filter)	Starlab, Ahrensburg (D)
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml / 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
PVDF-Membran, Immobilon™ P, Ø 0,45 µm	Millipore, Billerica (USA)
Rattler™ Ausplattier Glaskugeln	Zymo Research, Irvine (USA)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg (D)
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Skalpell no.11 Feather	Feather, Osaka (J)
Skalpell no.22 Feather	Feather, Osaka (J)
Steriflip Filter Unit	Merck Millipore, Burlington (USA)
Sterilfilter Ø 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Maidstone (UK)

2.3. Kits

Name	Hersteller
Dual-Luciferase Reporter-Assay System	Promega, Madison (USA)
E.Z.N.A.® FastFilter Plasmid DNA Maxi Kit	Omega Bio-tek, Inc., Norcross, (USA)
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Omega Bio-tek, Inc., Norcross, (USA)
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I	Omega Bio-tek, Inc., Norcross, (USA)
E.Z.N.A.™ DNA Probe Purification Kit	Omega Bio-tek, Inc., Norcross, (USA)
Frozen-EZ Yeast Transformation II	Zymo Research, Irvine (USA)
Omniscript® RT Kit	Qiagen, Hilden (D)
peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen (D)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2U/ µl)	NEB, Ipswich, (USA)
QuantiNova Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden (D)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
Supersignal® West Dura Extended Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford (USA)
Supersignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford (USA)
Transcriptor™ One-Step RT-PCR Kit	Roche, Mannheim (D)
Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II	Zymo Research, Irvine (USA)

2.4. Geräte

Name	Hersteller
Applied Biosystems StepOne, StepOnePlus	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Biometra Standard Power Pack P25	Analytik Jena AG, Jena (D)
Blotkammer Fastblot B44	Analytik Jena, Jena (D)
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, (D)
CERTOMAT® BS-T	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, (D)
Consort E132 Mini Electrophoresis Power Supply	Topac Inc., Cohasset (USA)
Consort EV231 Power Supply	Topac Inc., Cohasset (USA)
Eppendorf Reference Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen (D)
Geldoc 2000	Biorad, Hercules (USA)
Heracell™ 240i CO2-Inkubator	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Herasafe™ KS 12 biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	Thermo Fisher, Waltham (USA)
IKA Dry Block Heater 2	IKA, Staufen, (D)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop SP5 2	Leica, Wetzlar, (D)
Lichtmikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar, (D)
Lichtmikroskop Wilovert®	Will, Wetzlar (D)
Magnetrührer, MR2002	Heidolph, Schwabach (D)
Mikrowellengerät	Bosch, Stuttgart (D)
Minizentrifuge	Labnet, Edison, (USA)
Nanodrop Lite	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, (USA)
Ohaus Explorer Pro	Ohaus, Parsippany, (USA)
Photomoeter Lightwave 2	Biochrom, Cambridge (UK)
Pipettierhelfer accu-jet®, accu-jet® pro	Brand GmbH + Co Kg, Wertheim, (D)
Primus 25 Thermal Cycler	MWG-Biotech, Ebersberg, (D)
Reagenzglasschüttler Reax 2000	Heidolph, Schwabach (D)
SDS-PAGE Gelkammer Mini-Protean	Biorad, Hercules (USA)
Sprout Minizentrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, (USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg (D)
Überkopffrotierer	Heidolph, Schwabach (D)

Name	Hersteller
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel, (D)
Zeiss Primo Vert	Zeiss, Oberkochen (D)

2.5. Puffer

Name	Menge/Konzentration	Bestandteil
Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzanalyse	2 %	Bovines Serumalbumin (BSA)
	5 %	Glyzerin
	0,05	Natriumazid (NaN ₃)
	0,2%	Tween® 20
		in PBS _{def}
Blockierungspuffer für Western Blot	10 %	Magermilchpulver
		in PBS _{def}
KoIP-Puffer	20 mM	Tris/HCL, pH 7.5
	100 mM	NaCl
	1 %	Nonidet P-40
	17,5 mM	EDTA
		in dH ₂ O
PBS_{def}, pH7.5 Phosphatgepufferte Salzlösung (defizient), pH7.5	0,2 g	KCL
	0,2	KH ₂ PO ₄
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	8 g	NaCl
	ad 1 l	dH ₂ O
PBST	0,1 %	Tween® 20
	ad 1 l	PBS _{def}
Proteinprobenpuffer (4x)	10 ml	β-Mercaptoethanol
	200 mg	Bromphenolblau
	20 ml	Glycerin
	10 ml	1 M Tris/HCL, pH 6.8
	4 g	SDS
	ad 100 ml	dH ₂ O
Proteingellaufpuffer (10x)	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	30 g	Tris-Base
	ad 1 l	dH ₂ O
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,4%	SDS
	1 M	Tris/HCL pH 6.8
		in dH ₂ O
SDS-PAGE Trenngelpuffer	0,4 %	SDS
	1,5 M	Tris/HCL, pH8.8
		in dH ₂ O

Name	Menge/Konzentration	Bestandteil
50x TAE, pH 8,0	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	57,1 g	Essigsäure 0,5 M
	242 g	EDTA, pH 8,0
	ad 1 l	Tris-Base
		dH ₂ O
Transferpuffer (1x)	100 ml	Ethanol
	144 mg	Glycin
	300 mg	Tris
	ad 1 l	dH ₂ O
Antikörperpuffer für Westernblot	1%	Magermilchpulver
	0,1 %	Tween® 20
		in PBS _{def}
Waschpuffer für Western Blot	0,1%	Tween® 20
		in PBS _{def}

2.6. Lösungen

Name	Menge	Bestandteil
Ampicillin-Stammlösung	100 mg	Ampicillin
	ad 1 ml	dH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	25 mg	Kanamycin
	ad 1 ml	dH ₂ O

2.7. Wachstums/Selektionsmedien für Bakterienkultur

Name	Menge	Bestandteil
LB-Medium	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Pepton
	ad 1 l	dH ₂ O
LB-Agar (1,5%)	3,75 g	Bacto™-Agar
	ad 250 ml	LB-Medium

2.8. Wachstum/Selektionsmedien für Hefekultur

Name	Menge	Bestandteil
20% w/v D-Glucose-Lösung in dH₂O (in 500 ml Flasche)	60 g	D-Glucose
	ad 300 ml	dH ₂ O
		Mischen und Autoklavieren
YPD Vollmedium, flüssig (<u>Y</u> east <u>P</u> epton <u>D</u> extrose) (in 1 l Flasche)	10 g	Hefeextrakt
	20 g	Pepton
	ad 900 ml	dH ₂ O
		Mischen und Autoklavieren
		Nach abkühlen Zugabe D-Glucose
	100 ml	20% w/v D-Glucose-Lösung in dH ₂ O
YPD Vollmedium, Agarplatten (<u>Y</u> east <u>P</u> epton <u>D</u> extrose)	2,5 g	Hefeextrakt
	5 g	Pepton
	ad 225 ml	dH ₂ O
	5 g je 500 ml Flasche	Agar
		Mischen und Autoklavieren
		Nach abkühlen Zugabe D-Glucose
2x YPDA Vollmedium flüssig (<u>Y</u> east <u>P</u> epton <u>D</u> extrose <u>A</u> denin) (in 500 ml Flasche)	25 ml	D-Glucose 20% w/v in dH ₂ O
	Name	Menge
		Bestandteil
		10 g Hefeextrakt
		20 g Pepton
		30 ml Adenin (2 mg/ml, 0,2%)
		ad 400 ml dH ₂ O
		Mischen und Autoklavieren
0,5x YPDA Vollmedium, flüssig (<u>Y</u> east <u>P</u> epton <u>D</u> extrose <u>A</u> denin) (in 500 ml Flasche)		Nach abkühlen Zugabe D-Glucose
	100 ml	20% w/v D-Glucose Lösung in dH ₂ O
	2,5 g	Hefeextrakt
	5 g	Pepton
	7,5 ml	Adenin (2 mg/ml, 0,2%)
	ad 475 ml	dH ₂ O
		Mischen und Autoklavieren
		Nach abkühlen Zugabe D-Glucose
	25 ml	D-Glucose 20% w/v in dH ₂ O
SD-Basis, flüssig (Synthetically defined) (in 500ml Flaschen) (4x225ml)	20 g	Glucose
	ad 900 ml	dH ₂ O
		4x 500ml Flaschen vorbereiten
		Zugabe je 225 ml Glucose-Lösung
		Autoklavieren

Name	Menge	Bestandteil
SD-Basis, Agar (Synthetically defined) (für Agarplatten, in 500ml Flaschen) (4x225ml)	20 g	Glucose
	ad 900 ml	dH ₂ O
		4x 500ml Flaschen vorbereiten
	je 5 g	Agar
		Zugabe 225 ml Glucose
		Autoklavieren
Aminosäure-Mix (AS-Mix) für SD Medien	200 mg	Arginin
	300 mg	Isloeucin
	300 mg	Lysin
	200 mg	Methionin
	500 mg	Phenylalanin
	500 mg	Threonin
	300 mg	Tyrosin
	200 mg	Uracil
	1500 mg	Valin
	17 g	Hefe-Stickstoff-Basis (YNB)
	50 g	Ammoniumsulfat
	ad 1000 ml	dH ₂ O
		Steril filtrieren in 2x 0,5 l Flaschen
X-α-Gal Stock Solution (20 mg/ ml) DMF Unter Abzug, Glaspipette verwenden	250 mg	X-α-Gal
	12,5 ml	Dimethylformamid (DMF)
		8x 1,5 ml Aliquots herstellen und bei -20 °C lagern
Aureobasidin A Stock Solution (0,5 mg/ ml)	1 mg	Aureobasidin A
	2 ml	Ethanol
		3x 650 µl Aliquots herstellen und bei 4 °C lagern
Adenin-Lösung (2 mg/ml) für Selektions-Medien	400 mg	Adenin
	ad 200 ml	dH ₂ O
		Steril filtrieren
Histidin-Lösung (10 mg/ml) für Selektions-Medien	1000 mg	Histidin
	ad 100 ml	dH ₂ O
		Steril filtrieren
Leucin-Lösung (10 mg/ml) für Selektions-Medien	1000 mg	Leucin
	ad 100 ml	dH ₂ O
		Steril filtrieren
Tryptophan (10 mg/ml) für Selektions-Medien	1000 mg	Tryptophan
	ad 100 ml	dH ₂ O
		Steril filtrieren
SD -Trp, flüssig (SD ohne Tryptophan)	225 ml	SD-Basis
	25 ml	AS-Mix
	2,5 ml	Adenin
	0,5 ml	Histidin
	0,5 ml	Leucin

Name	Menge	Bestandteil
SD -Leu, flüssig (SD ohne Leucin)	225 ml	SD-Basis
	25 ml	AS-Mix
	2,5 ml	Adenin
	0,5 ml	Histidin
	0,5 ml	Tryptophan
SD -Trp, Agarplatten (SD ohne Tryptophan)		225 ml SD-Basis, Agar aufkochen
		Rührfisch hinzugeben, Rühren und Abkühlen
		Zugabe Komponenten
	25 ml	AS-Mix
	2,5 ml	Adenin
	0,5 ml	Histidin
	0,5 ml	Leucin
		1 min Rühren, dann Platten gießen
SD -Leu, Agarplatten (SD ohne Leucin)		225 ml SD-Basis, Agar aufkochen
		Rührfisch hinzugeben, Rühren und Abkühlen
		Zugabe Komponenten
	25 ml	AS-Mix
	2,5 ml	Adenin
	0,5 ml	Histidin
	0,5 ml	Tryptophan
		1 min Rühren, dann Platten gießen
DDO, Agarplatten SD -Trp-Leu Agarplatten (SD ohne Tryptophan ohne Leucin) (Double Dropout, DDO)		225 ml SD-Glukose-Basis Aufkochen
		Rührfisch hinzugeben, Rühren und Abkühlen
		Zugabe Komponenten
	25 ml	AS-Mix
	2,5 ml	Adenin
	0,5 ml	Histidin
		1 min Rühren, dann Platten gießen
QDO/X/A/3-AT, Agarplatten SD-Trp-Leu-Ade-His, (SD ohne Tryptophan, ohne Leucin, ohne Adenin, ohne Histidin) (Quadruple Dropout, QDO) (X-α-Gal, X) (Aureobasidin A) (3-Aminotriazol, 3-AT)		225 ml SD-Glukose-Basis Aufkochen
		Rührfisch hinzugeben, Rühren und Abkühlen
		Zugabe Komponenten
	25 ml	AS-Mix
	2,5 ml	3-Aminotriazol (1 M)
	62,5 μ l	Aureobasidin A (500 μ g/ml)
	0,5 ml	X- α -Gal (20 mg/ ml)
		1 min Rühren, dann Platten gießen

2.9. Wachstumsmedien für Säugetier/Humanzellen

Name	Menge/Konzentration	Bestandteil
DMEM+++ = DMEM_{+Q+P/S+10%FBS}	500 ml	DMEM
	50 ml	FBS (Fetales Rinderserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml
DMEM++3% = DMEM_{+Q+P/S+3%FBS}	500 ml	DMEM
	15 ml	FBS (Fetales Rinderserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml
DMEM++2% = DMEM_{+Q+P/S+2%FBS}	500 ml	DMEM
	10 ml	FBS (Fetales Rinderserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml
DMEM++0% = DMEM_{+Q+P/S+0%FBS}	500 ml	DMEM
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml
DMEM+Q = DMEM_{+Q}	500 ml	DMEM
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
IMDM+++ = IMDM_{+Q+P/S+10%FBS}	500 ml	IMDM
	50 ml	FBS (Fetales Rinderserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml

Name	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco®, Thermo Fisher, Waltham (USA)
Fetales Rinderserum (Fetal bovine serum, FBS)	Gibco®, Thermo Fisher, Waltham (USA)
OPTI-MEM™ I	Gibco®, Thermo Fisher, Waltham (USA)
Trypsin-EDTA (0,5%)	Gibco®, Thermo Fisher, Waltham (USA)

2.10. Nukleinsäuren

2.10.1. Größenmarker für Agarosegele

Name	Bereich	Bestandteil
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	75-20.000 bp	Thermo Fisher, Waltham (USA)
O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder	50-1.000 bp	Thermo Fisher, Waltham (USA)

2.10.2. Primer für Klonierungen/Sequenzierungen

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Markierungen (Tags) sind fett gedruckt.

Primer wurden durch die Firma Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific synthetisiert.

Nummer	Name	Sequenz 5'-3'
3230	#3230_Seq_AD-LD-S_REV	GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG
3394	#3394_MK_PCR_MVP30_Xma1_FWD	GTG <u>CCC GGG</u> TAT GCA ACA ACC TCG CGG AAG
3395	#3395_MK_PCR_MVP30_Sal1_REV	GTG <u>GTC GAC</u> TCA CTG TCC TTT ACC TTG ACT
3396	#3396_MK_Seq_pGBKT7_T7_FWD	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
3397	#3397_MK_Seq_pGBKT7_DNA-BD_REV	TTT TCG TTT TAA AAC CTA AGA GTC
3524	#3524_MK_Seq_pGADT7_AD_REV	AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG
3785	#3785 MKSeq CMV Fwd	CGCAATGGGCGGTAGGCGTG
3786	#3786 MKSeq hGH-PA Rev	CCAGCTTGTTCCCAATAGA
3807	#3807_MKSeq_mPIAS1_FW	AAA TTG GAA GAA CCT ATT CCA
3808	#3808_MKSeq_hPIASxalpha_FW	TCT TGT ACG GCA GCT TAC A
3809	#3809_MKSeq_hPIASxbeta_FW	AGA AGC GCC CTG GAC GCC CC
3864	#3864_Xho1_FLAG_mPIAS1_FWD	GTG AAT <u>CTC GAG</u> ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GCG GAC AGT GCG GAA CTA AAG
3865	#3865_mPIAS1_Xma1_RV	ACC AAT <u>CCC GGG</u> TCA GTC CAA TGA GAT AAT GTC TGG
3866	#3866_Xho1_HA_mPIAS1_FWD	GTG ATA <u>CTC GAG</u> ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GCG GAC AGT GCG GAA CTA AAG
3867	#3867_Xho1_FLAG_hPIASxalpha_FWD	GTG ATT <u>CTC GAG</u> ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GCG GAT TTC GAA GAG TTG AGG
3868	#3868_hPIASxalpha_Xma1_RV:	ACC AAT <u>CCC GGG</u> TCA CTG TTG CAC AGT ATC AGA AGA TGT TCC
3869	#3869_Xho1_HA_hPIASxalpha_FWD	GTG ATT <u>CTC GAG</u> ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GCG GAT TTC GAA GAG TTG AGG
3870	#3870_Xho1_FLAG_hPIASxbeta_FWD	GTG ATT <u>CTC GAG</u> ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GCG GAT TTC GAA GAG TTG AGG
3871	#3871_hPIASxbeta_Xma1_RV	ACC AAT <u>CCC GGG</u> TTA GTC CAA TGA GAT GAT GTC AGG
3872	#3872_Xho1_HA_hPIASxbeta_FWD	GTG ATT <u>CTC GAG</u> ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GCG GAT TTC GAA GAG TTG AGG
3893	#3893_Kpn1_FLAG_SETDB1#1_FWD	ATT ATA <u>GGT ACC</u> ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TCT TCC CTT CCT GGG TGC

Nummer	Name	Sequenz 5'-3'
3894	#3894_SETDB1#1_Pst1_RV	GTA TAG <u>CTG CAG</u> ACA TGA GGT AAG TAG AAA AGC TTC TCC ATG GGA GCA CGG TAG GAG GGC
3895	#3895_Pst1_SETDB1#2_FWD	GGT TCG <u>CTG CAG</u> CTA TAC CTG TCT GTC TCG AGT CAG ACC TAT GAG GAA TGA G
3896	#3896_SETDB1#2_Not1_RV	GAT AAT <u>GCG GCC GCC</u> TAA AGA AGA CGT CCT CTG CAT TCA ATG GCC CCA C
3906	#3906_Kpn1_HA_SETDB1#1_FW D	ATT ATA GGT ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TCT TCC CTT CCT GGG TGC ATT GGT TTG GAT GCA GCA ACA GC

2.10.3. Primer und Sonden für qRT-PCR

Nummer	Name	Sequenz
241	FiloA2.4	AAG CAT TTC CTA GCA ATA TGA TGG T
242	FiloA2.2	AAG CCT TTC CTA GCA ACA TGA TGG T
243	FiloA2.3	AAG CAT TCC CTA GCA ACA TGA TGG T
297	MARV rev	GGC AAG GTT GTA TTT CTC AAG ATC AGT
298	SEBOV rev	TTG CGG AAT TAG GAA GTG CAT CCA
299	ZEBOV rev	TGC GGG ATT GTA TAA TGC ATC CAA TT
300	Sonde1	FAM-TGG CAC CAC ACA AGT GAT GAT TTT GGT GAG-BHQ1
301	Sonde2	FAM-TGG CAT CAT ACA AGT GAT GAT TTC GGA GAG-BHQ1
302	Sonde3	FAM-CTT GGC ACC ATA ATT CAG CAA GCA TAG GG-BHQ1

2.10.4. Vektoren

Name	Ursprung
pCAGGS-MCS	Institut für Virologie, Marburg
pGBKT7	Clontech, Mountain View (USA)
pGADT7	Clontech, Mountain View (USA)

2.10.5. Rekombinante Plasmide

Vektor	Protein	Ursprung
pGBKT7	pGBKT7-53	Clontech, Mountain View, (USA)
pGADT7	pGADT7-T	Clontech, Mountain View, (USA)
pANDY	Minigenom 3M-5M_RLuc	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV GP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV L	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV NP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV VP24	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV VP35	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV VP40	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV VP30	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 (1-281)	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30-3LA	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 1-146	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 1-162	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 1-115	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 1-123	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 1-135	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 14-281	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 35-281	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	MARV _{HA} VP30 116-281	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS	T7 Polymerase	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)
pANDY	Minigenom 3E5E_RLuc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	EBOV GP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	EBOV L	B. Moss, NIH, Bethesda (USA)

Vektor	Protein	Ursprung
pCAGGS	EBOV NP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	EBOV VP24	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	EBOV VP35	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	EBOV VP40	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	EBOV VP30	Institut für Virologie, Marburg
	ISG54-Firefly-luc	D. Levy, NYU School of Medicine, New York (USA)
pCMV	Flag-hPIASx α	Ke Shuai, UCLA, Los Angeles (USA)
pCMV	Flag-hPIASx β	Ke Shuai, UCLA, Los Angeles (USA)
pCMV	Flag-mPIAS1	Ke Shuai, UCLA, Los Angeles (USA)

2.10.6. Erstellte Konstrukte

Konstrukt		Matrize	Primer
pGBKT7	VP30	pCAGGS MARV VP30	#3394, #3395
pCAGGS	Flag-mPIAS1	pCMV Flag-mPIAS1	#3864, #3865
pCAGGS	HA-mPIAS1	pCMV Flag-mPIAS1	#3866, #3865
pCAGGS	Flag-PIAS2 α	pCMV Flag-hPIASx α	#3867, #3868
pCAGGS	HA-PIAS2 α	pCMV Flag-hPIASx α	#3869, #3868
pCAGGS	Flag-PIAS2 β	pCMV Flag-hPIASx β	#3870, #3871
pCAGGS	HA-PIAS2 β	pCMV Flag-hPIASx β	#3872, #3871
pCAGGS	HA-SETDB1	mRNA Huh7 Zellen	#3906, #3894, #3895, #3896
pCAGGS	FLAG-SETDB1	pCAGGS-HA-SETDB1	#3893, #3894, #3895, #3986

2.11. Proteine/Enzyme/Antikörper

2.11.1. Enzyme

Name	Hersteller
peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen (D)
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) (10U/ μ l)	NEB, Ipswich, (USA)
Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Restriktionsenzyme Xma1 (20U/ μ l), Sal1-HF (20U/ μ l), Sfi1 (20U/ μ l), Xho1 (20U/ μ l), Kpn1-HF (20U/ μ l), Pst1-HF (20U/ μ l), Not1-HF 20U/ μ l), Dpn1 (20U/ μ l)	NEB, Ipswich, (USA)
DNase1 (RNase-Free DNase Set)	Qiagen, Hilden (D)
T4 DNA Ligase (20U/ μ l)	NEB, Ipswich, (USA)

2.11.2. Antikörper

2.11.2.1. Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Antikörper
			WB	IFA
α-Flag poly	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München (D)	1:500-1:1000	1:250
α-EBOV VP30 R1.61	Kaninchen	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:500	
α-MARV VP30 11-6-11	Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:500-1:1000	1:50
α-Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	1:500-1:1000	
α-NP 2	Meerschwein	Institut für Virologie, Marburg (D)		1:200
α-NP 59-9-10	Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:1000	
α-HA	Kaninchen	Rockland, Jacksonville, (USA)	1:500-1:1000	
α-Myc polyclonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz (USA)	1:500	

2.11.2.2. Sekundärantikörper Western Blot

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
α-Kaninchen	HRP	Schwein	Dako, Hamburg, (D)
α-Maus	HRP	Ziege	Dako, Hamburg, (D)
α-Maus	Alexa680	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)

2.11.2.1. Sekundärantikörper Immunfluoreszenz

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
α-Kaninchen	Alexa488	Ziege	Life Technologies, Carlsbad (USA)
x	DAPI	x	Sigma-Aldrich, München (D)
α-Meerschwein	Alexa594	Ziege	Life Technologies, Carlsbad (USA)
α-Maus	Marina Blue	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)

2.11.3. Affinitätsgele

Name	Spezies	Hersteller
α-Flag M2 Affinity Gel	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)
α-HA Affinity Gel	Maus	Sigma-Aldrich, München (D)

2.11.4. Proteinmarker

Name	Bereich	Hersteller
Pageruler Plus Prestained Protein Ladder	10-250 kDa	Thermo Fisher, Waltham (USA)

2.12. Zellen

Name	Ursprung
HAP1 Zellen	humane haploide Zellen aus Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie
HEK293 Zellen	humane embryonale Nierenzellen
Huh7 Zellen	humane Heptomazellen
VERO E6 Zellen	Nierenzellen <i>Grüne Meerkatze</i>
Y2HGold	Stamm der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hefe für die Durchführung von Hefe Zwei-Hybrid Versuchen
Y187	Stamm der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hefe für die Durchführung von Hefe Zwei-Hybrid Versuchen

2.13. Software

Name	Verwendung
Chromas 2.6.4	Sequenzanalysen
Clone Manager 9	Klonierungsstrategien
Graphpad Prism 7	Statistische Auswertung und Darstellung
Image Lab 6.0.0	Aufnahme und Auswertung von Western Blots
ImageJ 1.49s	Bearbeitung und Analyse von Immunfluoreszenzbildern
Leica LASAF 2.1.2	Aufnahme von Immunfluoreszenzbildern
LiCor Odyssey Imaging 2.1	Aufnahme und Auswertung von Western Blots
Mendeley Desktop 1.18	Literaturverwaltung
StepOne 2.3	Quantitative Realtime-PCR
XnView 2.40	Bildbearbeitung

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren für Klonierungsreaktionen und Analysen. Dabei wird ein DNA Fragment, das als Matrize dient, mit kurzen (15-35 Nukleotide) sequenzspezifischen DNA-Stücken (Primer), Nukleotiden, Puffer und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase gemischt. Die Primer rahmen die Zielsequenz ein und bestimmen so den zu amplifizierenden Bereich. Zusätzlich können die Primer mit Restriktionsschnittstellen zur weiteren Klonierung und bestimmten antigenen Erkennungsstellen (*Tag*) für die spätere Erkennung durch Antikörper oder anderen Modifikationen versehen werden.

Der fertige Ansatz wird in einem Thermocycler zyklisch auf bestimmte Temperaturen erhitzt, sodass es zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge, einer Anlagerung der Primer und schließlich zu einer Verlängerung derselben zu vollständigen Doppelsträngen kommt. Dadurch wird das anfängliche DNA-Fragment mit jedem Zyklus exponentiell vervielfältigt. Die hier verwendete Phusion DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine sehr geringe Fehlerrate und sehr hohe Geschwindigkeit aus.

Reaktionsansatz:

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
H ₂ O	Ad 50 µl	
5x Phusion Buffer	10 µl	1x
5 mM dNTPs	2 µl	200 µM each
Primer FW 10 µM	2,5 µl	0,5 µM
Primer RV 10 µM	2,5 µl	0,5 µM
Template DNA	10 ng	(1 pg-10 ng)
DMSO	x (1,5 µl)	(3%)
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl

Zyklusbedingungen:

Zyklus Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	5 s	30
Extension	72 °C	17 s	
Finale Extension	72 °C 4 °C	5 min hold	1

3.1.2. Umschreiben von RNA in DNA (Reverse Transkription)

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben von RNA in DNA im Rahmen von Klonierungen. Dort wird die interessierende mRNA mittels einer Reversen Transkriptase umgeschrieben in DNA und kann dann mittels PCR vervielfältigt werden und in der Klonierung eingesetzt werden. Hier wird für die Reverse Transkription das Omniscript Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers genutzt. Dabei werden ein Random Primer

Mix oder spezifische Primer für eine bestimmte mRNA verwendet. Die Inkubation erfolgt für 1 h (Stunde) bei 37 °C im Thermocycler.

Reaktionsansatz:

Bestandteile	Volumen	Final Konzentration
10x Puffer Omniscript	2 µl	1x
dNTP Mix (5 mM)	2 µl	0,5 mM
Random Primer Mix 60 µM	2 µl	6 µM
RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl	0,2 U/ µl
dH ₂ O RNase-frei	11,5 µl	
Template RNA	1 µl	
Total	20 µl	

3.1.3. Filoviruspezifische quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion zur Quantifizierung von MARV Genomen

Eine quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) vereint die Prozesse der Reversen Transkription und einer anschließenden PCR. Sie dient dazu, die Zahl viraler Genome von MARV in Zellkulturüberständen quantitativ zu bestimmen. Dazu kommt eine filovirus-spezifische qRT-PCR zum Einsatz, die Primer und Sonden umfasst, die gegen die virale Polymerase L von MARV, EBOV und SUDV gerichtet sind (2.10.3). Die Sonden tragen am 5-Ende den Farbstoff 6-FAM-Phosphoramidit (FAM) und am 3'-Ende den Black Hole Quencher 1 (BHQ-1). Es wird zudem eine Marburg-Virus-spezifische Standardkurve erstellt, die Konzentrationen von 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 Genomkopien als Fixpunkte umfasst, um die absolute Zahl viraler Genome zu bestimmen. Die Durchführung erfolgt mit Hilfe des QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) und des StepOnePlus Thermocyclers (Thermo Fisher). Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der StepOne 2.3 Software. Die Standardkurve dient der Umrechnung der Genomkopienzahl in C_T -Werte, anhand derer die Genomkopienzahl in den untersuchten Proben bestimmt wird. Durch Berücksichtigung der Ausgangsvolumina errechnet sich die Genomkopienzahl pro ml.

Reaktionsansatz:

Bestandteile	Volumen	Finale Konzentration
5xRT Puffer	6 µl	1x
dNTPs	1,2 µl	
MARV Primer vorwärts	0,6 µl	0,2 µM
SEBOV Primer vorwärts	0,6 µl	0,2 µM
ZEBOV Primer vorwärts	0,6 µl	0,2 µM
MARV Primer rückwärts	0,6 µl	0,2 µM
SEBOV Primer rückwärts	0,6 µl	0,2 µM
ZEBOV Primer rückwärts	0,6 µl	0,2 µM
MARV Sonde	0,24 µl	0,08 µM
SEBOV Sonde	0,24 µl	0,08 µM
ZEBOV Sonde	0,24 µl	0,08 µM
dH ₂ O	7,28 µl	
Quantitect Probe RT-Mix	1,2 µl	
Probe	10 µl	
Total	30 µl	

Zyklusbedingungen:

Zyklus Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	50 °C	30 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	20sek	46
Anlagerung	58 °C	45 sek	
Extension	72 °C	15 sek	

3.1.4. Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren dient dazu Reagenzien (Phenol, Ethanol, Enzyme etc.) zu entfernen, die in nachfolgenden Versuchen stören könnten und die Nukleinsäuren anzukonzentrieren. Die Aufreinigung von DNA aus PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdau oder von isolierter RNA kann über eine Säulenmatrix oder ein präparatives Gel erfolgen.

3.1.4.1. Aufreinigung von DNA per Säulenmatrix

Hier wird die DNA mittels eines Puffers an eine Säulenmatrix gebunden, mehrfach mit Puffer gewaschen und schließlich mit Wasser (dH₂O) eluiert. Verwendet wird hier das E.Z.N.A.[™] DNA Probe Purification Kit (Omega) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgt in 30 µl dH₂O.

3.1.4.2. Aufreinigung von DNA über eine Gelextraktion aus einem präparativen Gel

Die Gel-Extraktion von DNA aus Agarosegelen kann benutzt werden, um Fragmente spezifischer Größe aufzureinigen. Alle Puffer und Lösungen werden frisch angesetzt, um Kontaminationen der späteren aufgereinigten DNA zu vermeiden. Es wird zunächst ein präparatives Agarosegel hergestellt und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das interessierende DNA-Fragment wird aus dem präparativen Gel unter UV-Licht herausgeschnitten und anschließend erfolgt auch hier eine säulenbasierte Aufreinigung.

Verwendet wird hier das E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgt in 30 µl dH₂O.

3.1.4.3. Aufreinigung von zellulärer RNA per Säulenmatrix

Hier wird die RNA mit Hilfe eines Puffers an eine Säulenmatrix gebunden und mehrfach mit Puffer gewaschen. Zudem erfolgt ein Verdau von potentiell vorhandener DNA über einen DNase1-Verdau auf der Säule. Nach weiteren Pufferwaschschritten wird die RNA mit 40 µl Nuklease-freiem dH₂O eluiert. Die Durchführung erfolgt mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.1.4.4. Aufreinigung von viraler RNA per Säulenmatrix

Die Aufreinigung von viraler RNA erfolgt mit Hilfe des QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) Zunächst werden unter BSL4-Bedingungen 140 µl der Virus-Suspension mit 560 µl AVL, inklusive Carrier-RNA gemischt, 15 sek (Sekunden) durch Vortexen gemischt und 10 min inkubiert. Dann werden 560 µl 100% Ethanol hinzugegeben und nochmals durch Vortexen gemischt. Im Anschluss können die so inaktivierten Proben in neue Reaktionsgefäße transferiert und ausgeschleust werden. Die weiteren Schritte der Aufreinigung erfolgen unter BSL2 Bedingungen über die Säulenmatrix des Kits nach Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgt in 60 µl Puffer AVE.

3.1.5. Auftrennung von Nukleinsäuren (Agarose-Gelelektrophorese)

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Analyse von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe (Analytische Gele) und der Aufreinigung von DNA-Fragmenten (Präparative Gele). Durch Anlegen einer Spannung entsteht bei der Agarose-Gelelektrophorese ein elektrisches Feld in dem sich DNA-Fragmente aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen bewegen. Die Netzstruktur der Agarose im Gel sorgt dafür, dass sich dabei große Fragmente langsamer bewegen als kleinere Fragmente. Dadurch erfolgt eine Auftrennung.

Zunächst wird eine 1 %ige Agaroselösung in TAE-Puffer angesetzt, mittels Mikrowelle aufgekocht und in eine Gelform gegossen, in welche ein Kamm zur Bildung von Geltaschen eingesetzt wird. Anschließend wird das ausgehärtete Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben werden im Verhältnis 5:1 mit einem Ladepuffer versetzt (6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher) der einen Farbstoff und Glycerol enthält. Die Proben werden in die Taschen des Agarosegels gegeben. Zusätzlich wird ein DNA-Längenstandard aufgetragen (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher) der dem Größenvergleich dient. Danach erfolgt durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 45 min-1 h die elektrophoretische Auftrennung. Im Anschluss wird das Gel in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Dazu wird eine etwa 0,1 %ige Lösung von Ethidiumbromid in Wasser hergestellt, das Gel

hineingegeben und für etwa 20-40 min gefärbt. Das Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und macht diese dadurch unter UV-Licht sichtbar.

Bei präparativen Gelen wird zunächst die interessierende Bande unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Geldokumentation nach dem Färben oder Ausschneiden erfolgt am Geldokumentationssystem GelDoc 2000 (Biorad).

3.1.6. Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau, d. h. das Schneiden von DNA, kann zur Klonierung genutzt werden, um beispielsweise ein DNA-Fragment (Insert) in ein bakterielles Plasmid (Vektor) einzubringen oder herauszuschneiden. Außerdem kann es genutzt werden, um durch Schneiden unterschiedliche Fragmente eines DNA-Stückes zu erhalten, die nach Auftrennung Aussagen zu Länge und Sequenzen der DNA erlauben (Restriktionsanalyse). Des Weiteren kann ein Restriktionsverdau auch dazu genutzt werden spezifisch methylierte bakterielle DNA abzubauen.

Bei einem Restriktionsverdau werden Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) benutzt, die palindromische Sequenzen in der doppelsträngigen DNA (dsDNA) erkennen und spezifisch schneiden. Das Ansetzen erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Inkubation erfolgt für 1 h zum Abbau bakterieller DNA oder Analyse und für 5 h zur Klonierung.

3.1.6.1. Restriktionsverdau zum Abbau bakterieller DNA

Ein Restriktionsverdau zum Abbau bakterieller DNA dient der Entfernung der bakteriellen DNA bei einer PCR mit einem bakteriellen Plasmid als Matrize. Dazu kann das Enzym Dpn-1 genutzt werden. Dieses baut spezifisch methylierte DNA ab, wie z. B. die DNA der meisten Bakterien.

Reaktionsansatz:

Volumen	50 µl
PCR Produkt	30 µl
Puffer 10x	5 µl
Dpn-1	20 U
dH ₂ O	ad 50 µl

3.1.6.2. Restriktionsverdau zur Klonierung

Zur Klonierung können Vektor und Insert mit spezifischen Restriktionsenzymen (2.11.1) geschnitten werden. Dies erlaubt eine spätere Verbindung von Vektor und Insert und damit einen Einbau des Inserts in den Vektor. Umgekehrt kann es auch benutzt werden, um ein eingebautes Insert aus einem Vektor herauszuschneiden.

Reaktionsansatz:

Bestandteile	Vektor	Insert
DNA 2,5 µg	2,5 µg	2,5 µg
10xPuffer	5 µl	5 µl
Restriktionsendonuclease 1	10-20 U	10-20 U
Restriktionsendonuclease 2	10-20 U	10-20 U
dH ₂ O ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

3.1.6.3. Restriktionsverdau zur Analyse

Zur Analyse können DNA-Fragmente mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dies ergibt spezifische Fragmente, die im Agarosegel aufgetrennt und analysiert werden können.

Reaktionsansatz:

Bestandteile	Volumen
DNA	0,5 µg
10xPuffer	5 µl
Restriktionsendonuclease	10 U
dH ₂ O	ad 50 µl

3.1.7. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Die Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren, d. h. die Abspaltung von Phosphatresten dient dazu, eine spontane Religation des Vektors zu verhindern und die Spezifität und die Effizienz des Einbaus eines Inserts in den Vektor zu erhöhen. Hier wird eine alkaline Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Calf Intestine (CIP), NEB) verwendet. Diese katalysiert die Abspaltung von Phosphatresten von 3´- und 5´-Enden der DNA. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der DNA.

Reaktionsansatz:

Bestandteile	Volumen
Vektor-DNA nach Restriktionsverdau	30 µl
10xPuffer	5 µl
CIP (10 U/µl)	2 µl
dH ₂ O ad 50 µl	ad 50 µl

3.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Die Ligation erlaubt das Verbinden von doppelsträngiger DNA durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5´-Phosphat-Rest des einen Stranges und der 3´-Hydroxyl-Gruppe des anderen Stranges. Dadurch ist es möglich einzelne Fragmente, die man durch PCR oder Restriktionsverdau erhalten hat miteinander zu verbinden. Auf diese Weise können Inserts in einen Vektor eingebracht werden.

Für die Ligation wird die T4 DNA Ligase (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Sie wird hier zur Klonierung eines Inserts in einen Vektor eingesetzt. Dabei wird eine Religationskontrolle mitgeführt. Diese enthält alle Komponenten außer dem Insert und zeigt, wie effizient der Vektor in Abwesenheit des Inserts ligiert werden kann und damit wie spezifisch die Ligation abläuft.

Reaktionsansatz:

Ligation im Verhältnis 3:1	Ligation	Vektorkontrolle
dH ₂ O ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl
10x T4 Puffer	2 µl	2 µl
Vektor	100 ng	100 ng
Insert	Berechnen ca. 1/3	x Berechnen ca. 1/3
T4 DNA Ligase	1 µl	1 µl

3.1.9. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Die Transformation von Plasmid-DNA dient der Vermehrung der DNA in den Bakterienzellen. Hier werden *E.coli XL1 blue* verwendet, die chemokompetent sind, d. h. deren Hülle mit Hilfe von Chemikalien durchlässig gemacht wurde für eine spätere Aufnahme von Plasmiden. Die *E.coli XL1 blue* Zellen werden mit Hilfe des Mix & Go *E. coli* Transformation Kit & Buffer Set (Zymo research) entsprechend den Angaben des Herstellers kompetent gemacht und bei -80 °C für die spätere Verwendung eingefroren. Für die Transformation werden 50 µl *E.coli XL1 blue* Zellen je Ansatz auf Eis aufgetaut und 100 ng Plasmid-DNA je Ansatz hinzugegeben. Anschließend werden die Ansätze für 20 min auf Eis inkubiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Bei Transformation von Kanamycin-Resistenz-vermittelnden Plasmiden werden die Ansätze nach 20 min auf Eis in 200 µl S.O.C. Medium überführt und bei 37 °C, 600 rpm schüttelnd für 30-60 min inkubiert, bevor sie ausplattiert werden.

3.1.10. Selektion rekombinanter Bakterien

Die Selektion von rekombinanten Bakterien dient dazu, Bakterien, die bei der Transformation ein Plasmid aufgenommen haben, von solchen zu unterscheiden, die kein Plasmid aufgenommen haben. Zu diesem Zweck tragen die Vektoren für Klonierungen ein Antibiotika-Resistenzgen (z. B. Ampicillin). Dieses erlaubt den entsprechend transformierten Bakterien auf Nährmedien, die Ampicillin enthalten (LB-Agarplatten mit Ampicillin, Endkonzentration von 100 µg/ml) zu wachsen. Nicht transformierte Bakterien werden durch Ampicillin in ihrem Wachstum gehemmt. Dazu werden die Bakterienansätze aus der Transformation auf den LB-Agarplatten ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend können Klone von rekombinanten transformierten Bakterien von der Platte für die weitere Verwendung gepickt werden.

3.1.11. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient dazu bei der Klonierung zu bestimmen, welche der transformierten und selektionierten Klone ein spezifisches Insert der korrekten Größe enthalten. Sie stellt somit eine Alternative zu einer Analyse mittels Plasmidpräparation und folgender Restriktionsanalyse dar.

Zunächst werden Selektionsplatten, PCR-Reaktionsgefäße und Ansätze für Minipreps (3.1.12) in der erforderlichen Anzahl vorbereitet. Die gewünschten Klone werden gepickt, auf der Selektionsplatte ausgestrichen und in einem PCR-Reaktionsgefäß, in dem dH₂O vorgelegt wurde, losgeschüttelt. Die Pipettenspitze wird schließlich in den Ansatz für die Miniprep abgeworfen.

Es wird eine PCR mit den zur Klonierung verwendeten Primer durchgeführt, wobei das Insert der Klonierungs-PCR als Positivkontrolle dient. Die Lyse der Bakterien erfolgt bei der Initialen Denaturierung der PCR.

Die Selektionsplatten werden 16 h bei 37 °C, die Miniprepansätze für 16 h bei 37 °C, schüttelnd inkubiert. Die weitere Analyse der PCR-Ansätze erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Von Klonen, die sich in der PCR als positiv erweisen, können schließlich Minipreps erstellt werden.

3.1.12. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Vermehrung von bakteriellen Plasmiden erfolgt sehr effizient durch die Kultur der mit diesen Plasmiden transformierten Bakterien. Im Anschluss können die Bakterien lysiert und die bakterielle Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Auf diese Weise kann die Menge der verfügbaren Plasmid-DNA stark erhöht werden. Die Aufreinigung kann im kleinen Maßstab (Miniprep) oder großen Maßstab erfolgen (Maxiprep).

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA dient vor allem der weiteren Analyse der Plasmide, wie Restriktionsanalyse und Sequenzierung und der Bereitstellung von Plasmid-DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen. Es wird zunächst eine Flüssigkultur des interessierenden bakteriellen Plasmids angesetzt. Dazu werden etwa 5 ml LB-Flüssigmedium in einer 15 ml Röhre mit Antibiotikum versetzt (Miniprep) oder 100 ml LB-Medium in einem 500 ml Erlenmyerkolben (Maxiprep) (Ampicillin Endkonzentration 100 µg/ml). Die Kultur wird für 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe des E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega) bzw. des E.Z.N.A.® FastFilter Plasmid DNA Maxi Kit (Omega). Dabei wird die Plasmid-DNA über eine Säulenmatrix aufgereinigt. Die Bakterien der Ausgangskultur werden zunächst pelletiert und alkalisch lysiert. Das Lysat wird neutralisiert und die Proteine gefällt. Dann wird die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix gebunden, gewaschen und schließlich in 50 µl (Miniprep) bzw. 1,5 ml (Maxiprep) dH₂O eluiert.

3.1.13. Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen

Die Transformation dient hier der Expression der Plasmid-codierten Gene in Hefezellen im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays. Es werden *Saccharomyces cerevisiae* Hefezellen (Stämme Y2HGold und Y187, Clontech) transformiert. Zum Einsatz kommt das Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research) entsprechend den Angaben des Herstellers. Zunächst wird eine Vorkultur als Flüssigkultur der Hefezellen in YPD Vollmedium angesetzt und für 16 h, 30 °C schüttelnd inkubiert. 15 ml der Hauptkultur werden mit 1 ml Vorkultur angeimpft und 4-5 h, 30 °C schüttelnd inkubiert. Mittels Photometer wird bestimmt, ob die Kultur in der logarithmischen Wachstums-Phase ist ($OD_{600} < 1,5$ idealerweise $OD_{600} = 0,8-1$). Anschließend werden die Zellen pelletiert, Kompetenz induziert und Aliquots bei -80 °C für die weitere Verwendung eingefroren. Für die spätere Transformation werden die kompetenten Zellen aufgetaut, 10 µl Zellen werden zur Plasmid-DNA gegeben, mit Puffer EZ3 gemischt und für 1 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert, bevor sie auf den entsprechenden Medium-Agarplatten ausplattiert werden.

3.1.14. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Aufreinigung von Plasmiden aus Hefezellen dient der weiteren Analyse der Köderproteine und der gefundenen Interaktionspartner im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays. Zum Einsatz kommt das Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II Kit (Zymo Research) entsprechend den Angaben des Herstellers. Ein Teil einer Hefekolonie oder Flüssigkultur wird verwendet. Die Zellen werden mittels alkalischer Lyse unter Zugabe von Zymolyase (Lyticase) lysiert. Zymolyase löst dabei die Zellwände der Hefezellen auf. Anschließend erfolgt die Neutralisation des Lysats und die Bindung und Aufreinigung der Hefepasmide über eine Säulenmatrix. Die Elution erfolgt mit 10 µl dH₂O.

3.1.15. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure wurde das NanoDrop™ Lite Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Analyse erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die optische Dichte einer wässrigen Lösung ist hier proportional zu ihrem Gehalt an Nukleinsäuren. Der Nukleinsäuregehalt ergibt sich folgendermaßen:

$$\begin{aligned} & (DNA \text{ oder } RNA) \text{ Gehalt in } \mu\text{g}/\mu\text{l} \\ & = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor [(dsDNA: 50)(sRNA oder sDNA: 40)]} \end{aligned}$$

Zusätzlich gibt der Quotient $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ Hinweise darauf ob Verunreinigungen vorliegen. Reine Lösungen zeigen $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ Quotienten von 1,6 bis 2,0.

Verunreinigungen mit Proteinen führen zu niedrigen Werten, Verunreinigungen mit Phenol oder RNA führen zu höheren Werten.

3.1.16. Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von Nukleinsäuren dient hier der weiteren Sequenzanalyse bei Klonierungen, aber auch bei unbekannten Zielsequenzen, wie sie beim Hefe-Zwei-Hybrid-Assay erhalten werden. Die Sequenzierung erfolgt durch die Firma Microsynth Seqlab, der die Proben zugeschickt werden. Die Proben enthalten neben der Nukleinsäure den jeweiligen Primer.

Reaktionsansatz:

Plasmid DNA oder PCR Produkt	500-1000 ng
Primer	30 pmol
dH ₂ O	ad 15 µl

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Kultur von Hefezellen (Y2HGold-, Y187-Zellen)

Die Kultur der Hefezellen Y2HGold und Y187 erfolgt, um Versuche mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Assay durchzuführen. Es handelt sich bei Y2HGold und Y187 um *Saccharomyces cerevisiae* Hefezellen. Die Kultur von Y2HGold und Y187 erfolgt in YPD Vollmedium (2.8) Für die Kultur transformierter und selektionierter Hefeklonen wird das entsprechende Minimalmedium verwendet.

Für kleinere Kulturen werden 5 ml Medium in einer 15 ml Röhre vorgelegt und mit einem gepickten Hefeklon angeimpft. Für größere Kulturen werden in einer 50 ml Röhre 25 ml YPD-Medium vorgelegt und mit einem gepickten Hefeklon angeimpft. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C, Schüttelnd, für 16-18 h. Die Kulturen können für Transformationen (3.1.13) oder zur Proteinanalyse (3.3.1) verwendet werden oder eingefroren werden.

Das Einfrieren von Hefezellen erfolgt im jeweiligen Medium, d. h. in Vollmedium (z. B. YPD) oder in Selektionsmedium (z. B. SD-Trp). Dazu werden 500 µl Hefekultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 500 µl Glycerol hinzugegeben und gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Kultur auf Agarplatten werden 100-200 µl Hefesuspension auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Medium (Vollmedium oder Selektionsmedium) aufgetropft. Das Ausplattieren erfolgt mittels Glaskugeln (Rattler Plating Beads) oder Einmal-Drigalskispatel.

Für die Kultur unterschiedlicher Klone auf einer Platte, wie beim Screening im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wird zunächst eine 96-Well Platte vorbereitet und 100 µl dH₂O je Well mittels Mehrkanalpipette vorgelegt. Anschließend werden der Reihe nach Klone mit 10 µl Pipettenspitzen gepickt und durch Drehen im jeweiligen Well gelöst.

Anschließend werden mittels Mehrkanalpipette alle Klone resuspendiert und 5 µl Suspension auf eine neue Selektionsplatte (z. B. QDO/X/A/3-AT) aufgetropft.

3.2.2. Hefe-Zwei-Hybrid-Assay

Das kommerziell erhältliche Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) wurde verwendet, um neue Interaktionspartner für MARV VP30 zu identifizieren. Dieses System basiert auf dem Gal4 Transkriptionsfaktor. Das Köderprotein wird als Fusionsprotein mit der GAL4 DNA-bindenden Domäne exprimiert, während eine Bibliothek von Beuteproteinen als Fusionsprotein mit der GAL4 transkriptionell-aktivierenden Domäne exprimiert wird. Kommt es nun zu einer Interaktion zwischen Köder- und Beute-Protein so werden die GAL4 DNA-bindende und die GAL4 Transkriptionell-aktivierende Domäne in enge räumliche Nähe gebracht, der GAL4 Transkriptionsfaktor wird rekonstituiert und es kommt zur transkriptionellen Aktivierung der Reporter-Gene.

Im Fall des Matchmaker Gold Systems handelt es sich dabei um die vier verschiedenen Reportergene, AUR1-C, HIS3, ADE2, MEL1. Diese Reportergene erlauben schließlich in Kombination mit entsprechenden Minimalmedien eine Unterscheidung der Klone in denen eine Interaktion vorliegt von den übrigen.

Reportergen	Funktion	Wirkung
AUR1-C	Kodiert Enzym Inositol Phosphoryl Ceramid Synthase	Vermittelt Resistenz gegenüber Antibiotikum Aureobasidin A
HIS3	Erlaubt die Biosynthese von Histidin	Wachstum auf Medien ohne Histidin
ADE2	Erlaubt die Biosynthese von Adenin	Wachstum auf Medien ohne Adenin
MEL1	Kodiert für α-Galaktosidase	Umsetzung von X-α-Gal und Blaufärbung der Kolonie

Tabelle 1: Reportergene im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay

Zunächst wird das Gen des interessierenden Proteins (MARV VP30) subkloniert in den Köder Vektor pGBKT7 (pGBKT7-VP30). Es wird eine Maxiprep erstellt (3.1.12) und die Sequenz überprüft (3.1.16).

Anschließend wird der Ködervektor pGBKT7-VP30 in Y2HGold Hefezellen transformiert (3.1.13). Es wird eine Flüssigkultur eines positiven Klones in SD-Trp angelegt und inkubiert (3.2.1). Die Hefezellen werden mit Hilfe von Y-Per Lysereagenz lysiert (3.3.1) Nach Zusatz von 4x Probenpuffer werden die Proben mittels SDS-PAGE/ Western Blot (3.3.3, 3.3.4) auf Expression des Köderproteins analysiert.

Für das *Mating* (Paarung von haploiden Hefezellen) werden Y2HGold Hefezellen, die mit dem Ködervektor (pGBKT7-VP30) transformiert sind, gepaart mit Y187 Hefezellen, welche eine cDNA Bibliothek enthalten (Mate & Plate™ Library - Universal Human Normalized) (Clontech). Das Vorliegen heterozygoter Hefezellen, welches ein Zeichen für eine erfolgreiche Paarung der Zellen ist, wird mittels Lichtmikroskopie überprüft und

die Ansätze werden schließlich auf Minimalmedien (QDO/X/A/3-AT, 2.8) ausplattiert. Dabei handelt es sich um vierfach Minimalmedien (Quadrupel Dropout, QDO), welche kein Adenin, Histidin, Leucin oder Tryptophan enthalten. Zusätzlich ist diesen Medien X- α -Gal (X) und Aureobasidin A (A) zur Selektion zugesetzt. X- α -Gal färbt positive Klone blau. Aureobasidin A hemmt das Wachstum negativer Klone. Die Synthese von Leucin und Tryptophan wird durch Ködervektor (pGBKT7) und Beutevektor pGADT7) vermittelt. Für die Synthese von Adenin und Histidin bzw. die enzymatische Umsetzung von Aureobasidin und X- α -Gal ist eine Interaktion von Köder und Beuteprotein und eine Aktivierung des GAL4 Transkriptionsfaktors notwendig. Den QDO/X/A Medien wird darüber hinaus 10 mM 3-Aminotriazol zugesetzt. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor der Imidazolglycerol-Phosphat Dehydratase, die für die Histidin-Synthese von Bedeutung ist. Somit zeigen nur Klone mit einer starken Aktivität des HIS3 Reporters Wachstum auf diesen Medien. Durch die Zugabe von 3-AT wird somit die Stringenz der gefundenen Interaktionen bzw. Interaktionspartner erhöht. Dadurch sollen vor allem Klone mit einer starken Interaktion selektioniert werden.

Die gewachsenen positiven Klone werden zur Bestätigung noch einmal auf QDO/X/A/3-AT 10mM ausplattiert. Anschließend wird eine Flüssigkultur der Klone angesetzt, die Hefepasmide werden isoliert (3.1.14), anschließend transformiert in *E.coli XL1 blue* (3.1.9) und es wird eine Miniprep (3.1.12) durchgeführt. Die isolierten Plasmide werden sequenziert und in Hinsicht auf den enthaltenen cDNA Klon untersucht. Dazu wird mittels NCBI BLAST N und BLAST X (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert ob ein offener Leserahmen im richtigen Leseraster vorliegt. Anschließend werden Y2HGold Hefezellen kotransformiert mit dem entsprechenden Beuteplasmid und dem Köderplasmid (pGBKT7-VP30) oder einem leerem Köderplasmid (pGBKT7-leer) und ebenfalls ausplattiert auf QDO/X/A/3-AT 10mM. Ein Wachstum in Gegenwart von leerem Köderplasmid deutet auf eine falsch-positive Interaktion und hilft bei deren Ausschluss. Als Positivkontrolle dient die Kotransformation von pGBKT7-p53/ pGADT7-T. Als Negativkontrolle dient die Kotransformation von pGBKT7-Köder/ pGADT7-leer.

Die Interaktion wird nur dann als valide angesehen, wenn Positiv- und Negativkontrolle funktionell sind und sich Klonwachstum bei Kotransformation von Köder- und Beuteplasmid zeigt, bei gleichzeitig fehlendem Klonwachstum bei Kotransformation von leerem Köderplasmid und Beuteplasmid.

3.2.3. Kultur von eukaryotischen Zellen (HEK293-, Huh7-, HAP-Zellen)

Die Kultur von eukaryotischen Zellen wie HEK293, Huh7, und HAP-Zellen erfolgt, um in diesen Zelllinien Versuche Ko-Immunpräzipitationen, Minigenom-Assays und Infektionen durchzuführen. Bei HEK293 (Human embryonic kidney cell) handelt es sich

um eine humane Nierenzelllinie. Huh7 (Human hepatoma 7) stellen eine humane Leberkarzinomzelllinie dar. Da Nieren und Leber Zielorgane von Marburg-Virus und Ebola-Virus sind, stellen diese Zelllinien gute Modellsysteme für Infektionsversuche mit Filoviren dar. Die haploide HAP1 Zelllinie wurde für die Erstellung genetischer Screens aus der nahezu haploiden KBM-7 Ziellinie hergestellt (Carette *et al.*, 2009), welche wiederum aus einem Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie stammt (Andersson *et al.*, 1987; Kotecki, Reddy and Cochran, 1999). Da HAP1 Zellen haploid sind eignen sie sich gut für genetische Screens sowie die Erstellung von Knockout-Zellen (KO-Zellen), d.h. Zellen denen einzelne Gene fehlen. HAP1 Zellen wurden bereits erfolgreich für die Identifizierung von EBOV Eintrittsfaktoren eingesetzt (Carette *et al.*, 2011).

HEK293 und Huh7 Zellen werden in 75 cm² Flaschen in DMEM+++ (2.9), d. h. Dulbeccos's Modified Medium (DMEM) das mit Glutamin Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Rinderserum versetzt ist kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgt alle 3-4 Tage. Für das Splitten der Zellen wird das Medium entfernt und der konfluente Zellrasen mit 10 ml PBS_{def} gewaschen. Anschließend wird dieses entfernt und es wird 2 ml Trypsin hinzugegeben, das zu einem Ablösen der Zellen führt. Das Ablösen der Zellen wird durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt. In neue 75 cm² Flaschen wird Medium vorgelegt und die Zellen werden aufgeteilt. Für Versuche werden Zellen in Zellkulturplatten ausgesät. Das Aussäen erfolgt analog zum Splitten. Die Zellen werden zusätzlich mittels einer Neubauer(verbessert)-Zählkammer ausgezählt, um genau definierte Zellzahlen aussäen zu können. Bei HEK293-Zellen werden in der Regel 8×10^5 Zellen pro 6-Well ausgesät, was in etwa einer Konfluenz von 60 % am nächsten Tag entspricht. Bei Huh7 Zellen werden 2×10^5 Zellen pro 6-Well ausgesät, was in etwa einer Konfluenz von 50 % am nächsten Tag entspricht.

Die Kultivierung der HAP1 Zellen erfolgt in IMDM+++ (2.9), d. h. in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) versetzt mit Glutamin, Penicillin/Streptomycin und 10% fetalem Rinderserum. Das Splitten erfolgt mit IMDM Medium im Verhältnis 1:40-1:50 analog zu HEK293/Huh7 Zellen. Zu diesem Zweck werden die Zellen ebenfalls mit der Neubauer(verbessert)-Zählkammer ausgesät. Für Versuche werden 4×10^5 HAP1 Zellen pro 6-Well ausgesät, was einer Konfluenz von 60% entspricht.

3.2.4. Transfektion von eukaryotischen Zellen mit bakteriellen Plasmiden

Die Transfektion stellt das Einbringen von bakteriellen Plasmiden in eukaryotische Zellen dar. Dadurch können zuvor klonierte Gene in diesen Zellen exprimiert werden. Hier dient es der Expression von verschiedenen viralen und zellulären Genen, um in verschiedenen Versuchen Aussagen zu deren Wirkung treffen zu können. Für die

Transfektion wird hier das Transfektionsreagenz TransIT-LT1 (Mirus), nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei handelt sich um ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches ein Gemisch aus Lipiden und Protein/Polyamin darstellt. Für die Transfektion werden zunächst Zellen im entsprechenden Format ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt die Transfektion. Das Medium auf den Zellen wird zunächst gewechselt, falls dies für nachfolgende Versuche erforderlich ist (z. B. ohne Antibiotika oder FBS). Die DNA für die Transfektion wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Als serumfreies Medium wird Optimem (Thermo Fisher) für das Ansetzen der Transfektionskomplexe verwendet. Dazu wird eine entsprechende Menge Optimem vorgelegt und die entsprechende Menge TransIT-LT1 hinzugegeben, wobei die Menge an TransIT-LT1 3:1 im Verhältnis zur DNA Menge steht. Dieser Ansatz wird gemischt und für 5 min inkubiert. Anschließend wird die entsprechende Menge auf jeden vorgelegten DNA-Ansatz gegeben, wiederum gemischt und für weitere 15 min inkubiert. Zum Schluss werden die Transfektionsansätze auf die ausgesäten Zellen gegeben. Optional kann 4 h nach der Transfektion ein Wechsel des Mediums auf den Zellen erfolgen, um die Toxizität der Transfektion zu reduzieren.

3.2.5. Ko-Immunpräzipitation (KoIP)

Die KoIP Analyse dient dazu eine Interaktion zwischen zwei oder mehreren Proteinen nachzuweisen. Dabei wird eines der Proteine mit einer Markierung (*Tag*, z. B. HA-Tag, oder Flag-Tag) versehen, welches als Epitop für die Aufreinigung dient. Beide Proteine werden gleichzeitig in eukaryotischen Zellen transfiziert und exprimiert. Diese Zellen werden lysiert. Zur Aufreinigung kommen Agarose-Kügelchen zum Einsatz, an die Antikörper kovalent gebunden sind, welche gegen das Epitop der Markierung gerichtet sind. Die Agarose-Kügelchen werden zusammen mit dem Lysat inkubiert. Dadurch wird das markierte Protein gebunden. Interagieren weitere Proteine mit dem markierten Protein, so werden auch diese über das erste Protein gebunden und können nachfolgend durch SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden.

Hierzu werden 6- Wells mit HEK293 8×10^5 Zellen pro Well oder Huh7 Zellen 2×10^5 Zellen pro Well an Tag 0 ausgesät. An Tag 1 wird zunächst ein Mediumwechsel zu DMEM+Q vollzogen. Anschließend erfolgt die Transfektion der Zellen mit den für die markierten Proteine kodierenden Plasmiden (3.2.4). Um gleiche Plasmid-DNA Mengen bei der Transfektion zu gewährleisten werden Ansätze mit geringerer DNA-Menge mit Leervektor ausgeglichen. 4 h nach Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel zu DMEM+++.

48 h nach Transfektion werden die Zellen mittels Zellschaber in frischem eiskalten PBS_{def} geerntet, bei 800 g abzentrifugiert und in 500 µl KoIP-Puffer für 20 min bei Raumtemperatur lysiert. Dieser enthält 1 % Triton X-100 für die Zelllyse und 1x Complete

Protease Inhibitor, um einen Abbau der Proteine zu verhindern. Für die Immunpräzipitation (IP) werden 30 µl Maus anti-Flag M2 oder Maus anti-HA Affinitätsagarosegel (Sigma Aldrich) je Reaktionsansatz vorgelegt und je 4-mal mit KoIP Puffer gewaschen und bei 1500 g abzentrifugiert. Die Zelltrümmer der lysierten Zellen werden bei 16.000 g, 10min, 4 °C abzentrifugiert. Ein Aliquot wird als Expressionskontrolle entnommen. Das restliche Lysat wird für die IP verwendet und zur vorbereiteten Agarose gegeben und für 2 h, bei 4 °C, rotierend inkubiert. Nach der Präzipitation werden die Proben wiederum 4-mal gewaschen bevor das verbliebene Pellet in 4x Proteinprobenpuffer resuspendiert wird und in SDS-PAGE und Western Blot weiter analysiert wird.

3.3. Proteinbiochemische/immunologische Methoden

3.3.1. Ernte und Lyse von Hefezellen zur Proteinanalyse

Die Zellyse von Hefezellen zur Proteinanalyse erfolgt mit dem Y-PER™ Yeast Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher). 5 ml Flüssigkultur werden in einer 15 ml Röhre bei 3000 rcf, 5 min 4 °C abzentrifugiert und ggf. bei -20 °C gelagert. Das Pellet wird in 1 ml dH₂O resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels Zentrifugation bei 14.000 rcf, 10 min pelletiert.

Das Pellet wird in 50-100 µl Y-PER resuspendiert. Die Lyse erfolgt für 20 min, bei Raumtemperatur, schüttelnd mit 1.300 rpm. Anschließend wird das Lysat mit 4xPP versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecyl-Sulfat und β-Mercaptoethanol, sowie das Erhitzen sorgen für eine Denaturierung der Proteine. Im nächsten Schritt können die Proben in SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden.

3.3.2. Ernte und Lyse von eukarotischen Zellen zur Proteinanalyse

Die Zellen werden in der 6 Well Platte ggf. zunächst mit 1 ml PBS_{def} gewaschen. Anschließend werden Sie mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden sie bei 8000 rpm, 4 °C, 5 min abzentrifugiert, in 75 µl PBS_{def} + 25 µl 4xProbenpuffer resuspendiert und bei 100 °C für 10 min erhitzt. Im Probenpuffer enthaltenes Natriumdodecyl-Sulfat und β-Mercaptoethanol sorgen dabei zusammen mit dem Erhitzen auf 100 °C für eine Denaturierung der Proteine. Im Anschluss können die Proben in SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden.

3.3.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-vermittelte Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt eine Auftrennung von Proteinen entsprechend

ihrer Größe (Laemmli, 1970). Auf diese Weise können Proben hinsichtlich der Größe und des Gehalts der enthaltenen Proteine untersucht werden.

Es werden zunächst Zellysate hergestellt (3.3.1, 3.3.2). Das im Probenpuffer enthaltene anionische Natriumdodecylsulfat bindet dabei an Proteine und sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung aller Proteine. Dadurch können Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung entsprechend ihrer Größe im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Nach der Denaturierung durch Aufkochen verhindert die negative Ladung durch Abstoßung außerdem eine Renaturierung der Proteine. Dem Probenpuffer zugesetztes β -Mercaptoethanol dient außerdem dazu Disulfid-Brücken aufzubrechen.

Im nächsten Schritt können die Proteine dann in einer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden. Zu diesem Zweck werden diskontinuierliche Polyacrylamidgele hergestellt, d. h. Gele bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das 4 %ige Sammelgel dient der Ankonzentrierung der Proteine. Das höherprozentige Trenngel (10-12 %) dient der eigentlichen Auftrennung der Proteine. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Biorad-Mini-Protean Gelkammer mit einer Consort EV231 Stromquelle mit 100 V bis zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel und anschließend mit 177 V bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung.

3.3.4. Elektrophoretischer Proteintransfer (Western Blot)

Der Western Blot dient dem Transfer von Proteinen aus einem Gel der SDS-PAGE auf eine Trägermembran mit deren Hilfe ein sensitiver Proteinnachweis möglich ist. Zunächst werden Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wird das Gel entnommen und es erfolgt der Transfer auf eine Trägermembran. Dabei werden die Proteine mittels Elektrophorese an die Trägermembran (Nitrocellulose (NC) oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)) gebunden und können im nächsten Schritt immunologisch nachgewiesen werden.

Der Proteintransfer erfolgt hier nach dem Semi-Dry Prinzip. Es werden 6 Whatman Papiere (6 cm x 9 cm), sowie eine Trägermembran (NC oder PVDF, 5,7 cm x 8,6 cm) und das entsprechende Gel benötigt. Die hydrophobe PVDF Membran muss zunächst in Methanol aktiviert werden, um Proteine aufnehmen zu können. Bei Nitrocellulosemembranen ist dies nicht notwendig. Anschließend werden Whatman-Papiere sowie Trägermembran in Transferpuffer getränkt und äquilibriert. Der Aufbau erfolgt nach folgendem Schema.

Aufbau
Kathode
3x Whatmanpapier
Polyacrylamidgel aus SDS-PAGE
Trägermembran (Nitrocellulose oder PVDF)
3x Whatmanpapier
Anode

Die einzelnen Membranstapel werden anschließend mit einer Pipette überrollt, um evtl. vorhandene Luftblasen zu entfernen, die den Transfer stören würden. Anschließend erfolgt die Elektrophorese bei 43 mA pro Blot für 1,5 h in der Fastblot B44 Blotkammer.

3.3.4.1. Immundetektion von Proteinen

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine Trägermembran mittels Western Blot können diese Proteine mittels Immundetektion nachgewiesen werden.

Als erstes erfolgt das Blocken der Trägermembran. Dabei werden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt mit unspezifischem Protein, welches durch die Antikörper nicht erkannt wird. Dies dient der Reduktion von unspezifischem Hintergrundsignal in der späteren Detektion. Dazu wird die Trägermembran nach dem Western Blot in 10 % (m/v) Magermilchpulver gelöst in PBS_{def} bei RT, für 1 h schüttelnd inkubiert.

Als nächstes wird die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert, die gegen das gesuchte Protein gerichtet sind (1.1.1). Dazu wird der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in 1 % Milchpulver (m/v) in PBST angesetzt und die Membran anschließend für 1 h schüttelnd in der Antikörperlösung inkubiert. Es folgen drei Waschschrte in PBST von 3 min. Anschließend wird die Membran mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser dient der eigentlichen Detektion des Proteins. An diesen ist entweder eine Meerrettich-Peroxidase oder ein Fluorophor als Reporter gebunden. Außerdem sorgt der Zweitantikörper für eine Verstärkung des Signals in der Detektion. Es wird eine Verdünnung des Zweitantikörpers in 1 % Milchpulver (m/v) in PBST angesetzt. Die Membran wird anschließend darin für 1 h schüttelnd inkubiert. Im Anschluss folgen zwei Waschschrte in PBST und drei Waschschrte in PBS_{def} von je 3 min. Zum Schluss wird die Membran der Detektion unterzogen. Dazu wird entweder das fluoreszenzbasierte Odyssey System (Li-Cor) oder das chemilumineszenz-basierte Chemidoc MP System (Biorad) verwendet.

Beim Chemidoc System erzeugt die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase mit Hilfe des Substrats ein Chemilumineszenzsignal, das vom Chemidoc detektiert wird. Im Falle des Odyssey Systems wird direkt die Fluoreszenz des Zweitantikörpers detektiert.

3.3.5. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Die Immunfluoreszenzanalyse erlaubt es, die Lokalisation von Proteinen in einer Zelle mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren. Bei der indirekten Immunfluoreszenzanalyse wird der Primärantikörper mit Hilfe eines Sekundärantikörpers detektiert und dadurch indirekt das gesuchte Protein. Daher wird diese Methode als indirekte Immunfluoreszenzanalyse bezeichnet. Der Primärantikörper ist gegen ein Epitop

(monoklonal) oder mehrere Epitope (polyklonal) des gesuchten Proteins gerichtet. Der Sekundärantikörper ist gegen den konservierten Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert, der die spätere Detektion erlaubt. Außerdem sorgt der Sekundärantikörper durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper für eine Verstärkung des Signals. An einem Fluoreszenzmikroskop kann der Fluoreszenzfarbstoff mit einer Lichtquelle oder einem Laser spezifisch angeregt werden und emittiert seinerseits ein Lichtsignal, das die Lokalisation des gesuchten Proteins anzeigt.

Für die Immunfluoreszenzanalysen werden Huh7 Zellen auf Deckgläschen in 6-Well Platten ausgesät. Dazu werden in je Vertiefung einer 6-Well Platte drei sterile Deckgläschen vorgelegt. Anschließend werden Huh7 Zellen ausgezählt und 1×10^5 Zellen je Vertiefung ausgesät (3.2.3). Dies führt am nächsten Tag zu einer Konfluenz von etwa 50 %, die eine ideale Darstellung der Zellen in der späteren Analyse erlaubt. Am nächsten Tag werden die Zellen mit Plasmiden für die gewünschten Proteine transfiziert (3.2.4). 48 h nach Transfektion werden die Deckgläschen für mindestens 20 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) gelöst in DMEM fixiert. PFA sorgt für eine Vernetzung aller Proteine und somit für die Fixierung. Als nächstes werden die Deckgläschen 3-mal mit PBS_{def} für je 5 min gewaschen, um überschüssiges PFA zu entfernen. Dann werden die Deckgläschen für 5 min in 100 mM Glycin in PBS_{def} inkubiert. Dieses reagiert mit ggf. noch vorhandenem PFA und reduziert auf diese Weise den Hintergrund in der späteren Analyse. Anschließend werden die Zellen auf den Deckgläschen mit Hilfe von 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS_{def} behandelt und somit permeabilisiert. Bei Triton X-100 handelt es sich um ein Detergens, welches die Zellmembran durchlässig macht, so dass die Antikörper die gesuchten Proteine erreichen können. Zum Schluss der Vorbehandlung werden die Deckgläschen in Blocking Buffer geblockt, d. h. mit unspezifischem Protein behandelt, um eine unspezifische Bindung von Antikörper an das Präparat zu verhindern.

Im nächsten Schritt erfolgt die Färbung. Dazu wird der Primärantikörper in Blocking Buffer verdünnt. Es wird eine feuchte Kammer aufgebaut, indem in einer geschlossenen Schale ein feuchtes Papiertuch ausgelegt wird, auf dem ein Stück Parafilm platziert wird. Auf diesem werden 30 µl Antikörperverdünnung in Blocking Buffer vorgelegt und ein Deckgläschen mit der Zellseite hineingelegt. Das Deckgläschen wird mit dem Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird es 3-mal mit PBS_{def} gewaschen, bevor es analog zum Primärantikörper mit dem Sekundärantikörper inkubiert wird. Hier ist aufgrund der Lichtsensitivität des Fluoreszenzfarbstoffs auf eine verdunkelte Inkubation zu achten. Zum Schluss wird das Deckgläschen 3-mal je 5 min in PBS_{def} gewaschen und kurz in dH₂O geschwenkt, bevor es mit Hilfe von Fluoprep

(+DABCO) auf einem Objektträger mit der Zellseite nach unten eingedeckelt wird. Das DABCO dient dazu, ein Ausbleichen der Präparate unter Lichteinfluss zu verhindern. Die Mikroskopie erfolgt mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiophot (Zeiss) und des konfokalen Laser Scanning Mikroskops TCS SP5 2 (Leica), die Auswertung mit Hilfe von ImageJ1.49s und Xnview2.40. Kolokalisationsanalysen erfolgen mit Hilfe des ImageJ Plugins Coloc2.

3.3.6. IFIT2-(ISG54) Firefly Luziferase Reporter-Assay

Bei IFIT2 (*IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats*, IFIT) handelt es sich um ein Interferon-induziertes antivirales Protein, das in der Lage ist eine Hemmung der viralen und zellulären Translation zu bewirken (Diamond and Farzan, 2013) und zusammen mit IFIT1 auch an der Erkennung viraler RNAs beteiligt ist (Pichlmair *et al.*, 2011).

Paulson *et al.* entwickelten einen Luziferase-Assay, der dazu dient die Stimulation von IFIT2 zu detektieren. Dieser besteht aus einer Firefly Luziferase unter Kontrolle eines humanen IFIT2-Promotors. IFIT2 zählt zu den Interferon-stimulierten Genen (Interferon-stimulated genes, ISG) und wird beispielsweise durch Bindung von Interferon- β an Zielzellen stimuliert. Daher kann dieser Assay eingesetzt werden, um Einflüsse von Proteinen auf die Interferon- β Signalkaskade zu studieren.

Das IFIT2-Reporter-System wird in HEK293 Zellen verwendet. Dazu werden diese ausgesät (3.2.3) und transfiziert (3.2.4) mit dem IFIT2-Firefly Reporter Konstrukt, sowie weiteren zu testenden Expressionsplasmiden. 24 h nach der Transfektion erfolgt die Stimulation der Zellen mit Interferon- β . Dazu werden 1000 U/ml Interferon- β in DMEM3%++ Medium angesetzt und ein Wechsel zum Interferon- β haltigen Medium durchgeführt. 48 h nach Transfektion und damit 24 h nach Start der Interferon- β Behandlung erfolgt die Ernte der Zellen und die Messung der Proben im Luziferase-Assay (3.3.7). Die Aktivität der Firefly-Luziferase ist hierbei ein Maß für die Aktivierung des IFIT2 Promotors durch die Interferon- β Behandlung. Eine ggf. zusätzlich transfizierte Renilla-Luziferase kann der Normalisierung von Unterschieden in der Transfektion und zellulären Transkription dienen.

3.3.7. Luziferase-Assay

Die Luziferase-Assays werden mit Chemikalien von Promega durchgeführt. Dazu werden die Zellen aus IFIT2-Assays (3.3.6) oder Minigenom-Assays (3.4.2, 3.4.3) mit PBS_{def} gewaschen und mit einem Zellschaber gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei 8000 rpm, 5 min, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 100 μ l Passive Lysis Buffer gelöst und zur Zelllyse 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit werden die Ansätze in einem Abstand von 5 min gevortext, um die Lyse zu erleichtern. Anschließend werden die Lysate bei 14.000

rpm für 5 min abzentrifugiert und je 10 µl des Überstandes werden im Luziferase-Assay für die Messung der Renilla- bzw. der Firefly-Luziferaseaktivität eingesetzt. Die Aktivität einer ggf. zusätzlich transfizierten Luziferase kann genutzt werden, um eine Normalisierung vorzunehmen und dadurch Unterschiede in der Transfektionseffizienz und der zellulären Transkription auszugleichen.

3.4. Virologische Methoden

3.4.1. Reverse Genetik

In der klassischen Genetik werden anhand eines Phänotyps Rückschlüsse auf den betreffenden Genotyp gezogen. Im Gegensatz dazu wird in der reversen Genetik von Viren der virale Genotyp verändert und es werden die Auswirkungen auf den Phänotyp untersucht.

Reverse Genetik Systeme stellen experimentelle Werkzeuge dar, die eine Produktion und virale Transkription und Replikation von viralen RNA Genomen auf der Basis von komplementärer DNA (cDNA) erlauben (Hoenen *et al.*, 2011).

Sie erlauben es rekombinante Viren herzustellen (Volle-Länge Klonierungssysteme) oder einzelne Prozesse des viralen Replikationszyklus isoliert zu untersuchen (Replikationszyklus-Modellsysteme). Replikationszyklus-Modellsysteme können dabei den gesamten Replikationszyklus (Virus-ähnliche Partikel Assays) oder einzelne Teile wie Transkription und Replikation (Minigenom Assays) umfassen. Replikationszyklus-Modellsysteme erlauben zudem eine vereinfachte Untersuchung von viralen Prozessen von hochpathogenen Viren.

Es existieren eine Reihe verschiedene Reverse Genetik Systeme für Filoviren (Hoenen *et al.*, 2011; Schmidt and Mühlberger, 2016). So existieren für MARV und EBOV spezifische Minigenom-Assays (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999), VLP-Assays und infektiöse VLP-Assays (Watanabe *et al.*, 2004; T. Hoenen *et al.*, 2006; Wenigenrath *et al.*, 2010) sowie Volle-Länge Klonierungssysteme zur Erstellung rekombinanter Viren (Enterlein *et al.*, 2006) (Hoenen *et al.*, 2011; Schmidt and Mühlberger, 2016).

3.4.2. Marburg-Virus spezifischer Minigenom-Assay

Der Marburg-Virus spezifische Minigenom-Assay, der als erster Filovirus-spezifischer Minigenom-Assay etabliert wurde, erlaubt es die Prozesse der Transkription und Replikation von Marburg-Virus unter BSL2 Laborbedingungen zu untersuchen (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999). Auf diese Weise können die Prozesse der viralen Transkription und Replikation isoliert und ohne die Notwendigkeit eines BSL4 Labors betrachtet werden.

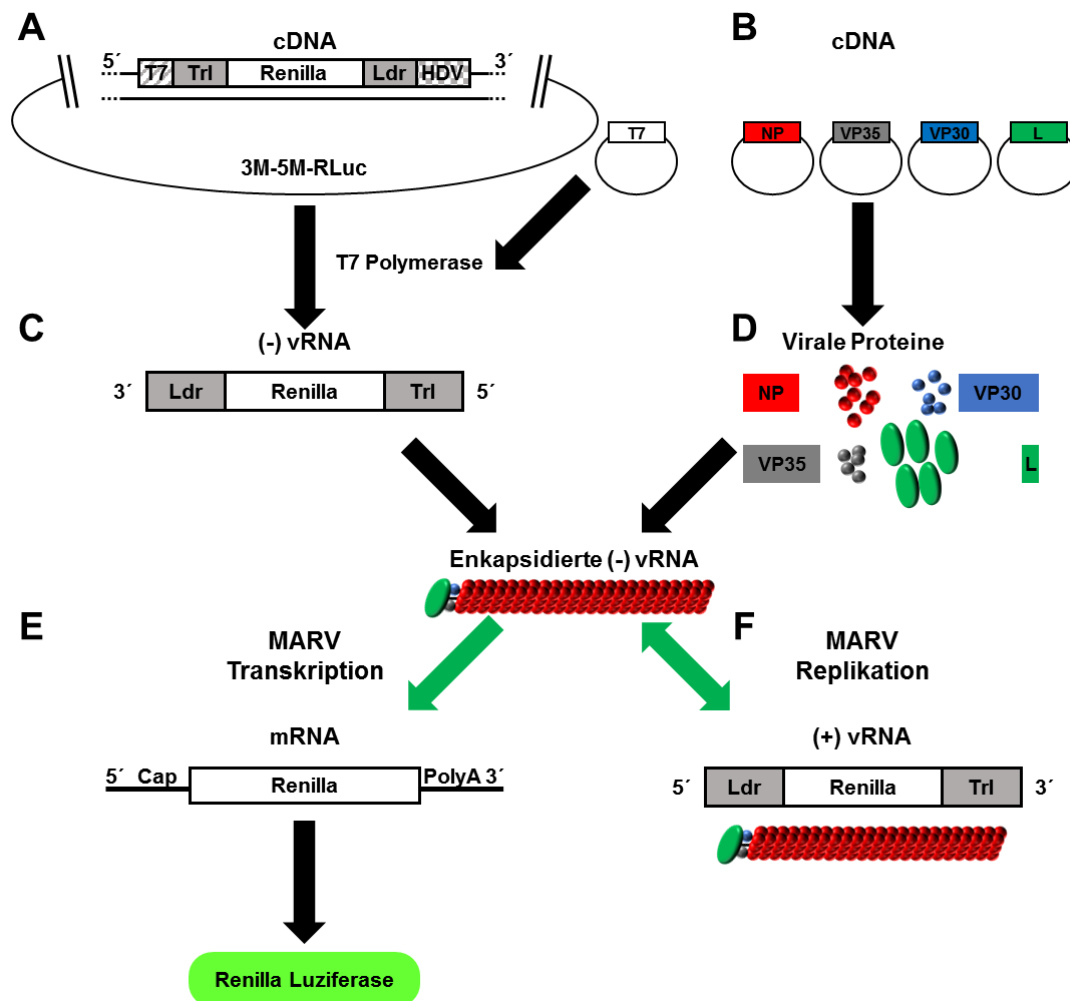


Abbildung 11: Aufbau und Funktionsweise des MARV Minigenom-Assays.

(A) Aufbau des Minigenoms 3M-5M-RLuc: T7: T7-Promotor, Trl: Trailer-Bereich des MARV-Genoms, Renilla: Renilla-Luziferase, Ldr: Leader-Bereich des MARV-Genoms, HDV: Hepatitis Delta Virus Ribozym-Bereich. (B) Virale Proteine NP, VP35, VP30 und L werden ektopisch mittels Plasmiden exprimiert. (C) Virale RNA (vRNA) in Negativstrang-Orientierung entsteht durch Transkription des Minigenoms durch die DNA-abhängige T7-RNA-Polymerase (D) Die (-) vRNA wird durch die viralen Proteine enkapsidiert. (E) Der virale Transkriptionskomplex aus der vRNA und den Proteinen NP, VP35, VP30 und L transkribiert mRNAs, die von der Zelle in Renilla-Luziferase Protein exprimiert wird und im Luziferase-Assay gemessen werden kann. (F) Der virale Transkriptionskomplex erzeugt eine Positivstrang vRNA, die als Matrize für die Replikation dient.

Kernstück des Minigenom-Assays ist das Minigenom (Abbildung 11, A). Dabei handelt es sich um eine cDNA der nicht-codierenden 3'-Leader- und 5'-Trailer-Bereiche des

viralen RNA-Genoms in Positivstrang-Orientierung. Die codierenden Bereiche für die viralen Proteine fehlen. Diese wurden beim Minigenom durch ein Reporter-gen, zunächst durch eine Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999), später durch eine Renilla-Luziferase ausgetauscht (Abbildung 11, A) (Wenigenrath *et al.*, 2010). Das Reporter-gen liegt in negativer Orientierung vor und wird flankiert von *Leader*- und *Trailer*-Bereichen des Marburg-Virus Genoms. Vor dem *Trailer*-Bereich liegt ein T7 Promotor, der die spezifische Transkription des Minigenoms mittels einer transfizierten T7 Polymerase, einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase, erlaubt. Der hinter dem Leader angeordnete Ribozym-Bereich des Hepatitis-Delta-Virus (HDV) stellt dabei durch autolytische Spaltung ein korrekt geschnittenes 3'-Ende sicher.

Für die Durchführung des Minigenom-Assays werden neben dem Plasmid, für das Minigenom 3M-5M-RLuc weitere Plasmide transfiziert, welche die übrigen viralen Proteine des Transkriptions- bzw. Replikationskomplexes codieren, d. h. NP, VP35, VP30 und die virale Polymerase L (Abbildung 11, B, D). Darüber hinaus ist es notwendig ein Plasmid für die T7-Polymerase zu transfizieren, welche die initiale Transkription des Minigenoms in eine virale RNA (vRNA) erlaubt. Außerdem kann zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein Plasmid mitgeführt werden, welches eine Firefly-Luziferase codiert.

In Anwesenheit der T7-Polymerase wird das Plasmid-codierte Minigenom nun mit Hilfe des T7 Promotors in eine virale RNA umgeschrieben (Abbildung 11, C). Der HDV Ribozym Bereich sorgt dabei für die korrekte Spaltung des 3'-Endes. Die so erzeugte virale RNA in negativer Orientierung wird von den viralen Proteinen enkapsidiert und kann der viralen Polymerase L als Matrize für die virale Transkription und Replikation dienen. Dabei entstehen mRNAs die zur Bildung des Reporters, der Renilla-Luziferase führen (Abbildung 11, E). Gleichzeitig erzeugt der virale Replikationskomplex auch vRNAs in positiver Orientierung, die wiederum als Matrize für die Replikation dienen (Abbildung 11, F). Dies führt durch die Steigerung der Anzahl an vRNAs auch zur vermehrten Bildung von mRNAs. Die so entstandene Renilla-Luziferase spiegelt daher die Aktivität von Transkription und Replikation wider und kann in einem Luziferase-Assay (3.3.7) gemessen werden.

Für die Durchführung werden 8×10^5 HEK293 Zellen je Well im 6-Well Format ausgesät (3.2.3) und am nächsten Tag mit allen erforderlichen Plasmiden (Tabelle 2) transfiziert (3.2.4). Dazu werden Optimem und TrasIT-LT1 gemischt und 5 min inkubiert. Anschließend wird die entsprechende Menge auf jeden DNA-Ansatz gegeben, gemischt und für 15 min inkubiert. Währenddessen erfolgt ein Mediumwechsel der Zellen zu Serum-freien Optimem. Nach der Inkubationszeit werden die einzelnen

Transfektionsansätze in die jeweiligen Vertiefungen der 6-Well Platte getropft und kurz orthogonal geschwenkt. Nach 4 h erfolgt ein Mediumwechsel zu DMEM++3%.

Vektor	Gen/Protein	Menge [ng]
pAndy	3M-5M-Rluc	1000
pCAGGS	MARV L	1000
pCAGGS	MARV VP30	100
pCAGGS	MARV VP35	100
pCAGGS	MARV NP	500
pCAGGS	T7	500
pGL4.13	Firefly	100

Tabelle 2: Erforderliche Plasmide für MARV Minigenom-Assay.

48 h nach der Transfektion werden die Zellen geerntet und in einem Luziferase-Assay (3.3.7) gemessen. Die Aktivität der ggf. zusätzlich transfizierten Firefly-Luziferase kann dabei genutzt werden, um eine Normalisierung vorzunehmen und Unterschiede in der Transfektionseffizienz und der zellulären Transkription auszugleichen.

3.4.3. Ebola-Virus spezifischer Minigenom-Assay

Der Ebola-Virus spezifische Minigenom-Assay wurde analog zum Marburg-Virus-spezifischen Minigenom-Assay entwickelt (Mühlberger *et al.*, 1999) und ist auch analog zu diesem aufgebaut (Vergleich 3.4.2). Auch hier wurden die codierenden Bereiche des viralen Genoms durch eine CAT (Mühlberger *et al.*, 1999) und später durch eine Renilla-Luziferase als Reporter ersetzt (Thomas Hoenen *et al.*, 2006). Die Renilla-Luziferase wird flankiert von den 3'-Leader- und 5'-Trailer-Bereichen des EBOV Genoms. Der Transkriptionsstart erfolgt über einen T7-Promotor und die korrekte Spaltung des 3'-Endes über einen HDV Ribozym Bereich. Für die Durchführung werden neben dem Minigenom 3E-5E-RLuc die übrigen Proteine des viralen Transkriptions- bzw. Replikationskomplexes benötigt, d. h. EBOV NP, VP35, VP30 und die Polymerase L. Außerdem wird die T7 Polymerase für die initiale Transkription des Minigenoms in die vRNA benötigt.

Vektor	Gen/Protein	Menge [ng]
pAndy	3E-5E-RLuc	250
pCAGGS	EBOV L	1000
pCAGGS	EBOV VP30	100
pCAGGS	EBOV VP35	125
pCAGGS	EBOV NP	125
pCAGGS	T7	250
pGL4.13	Firefly	100

Tabelle 3: Erforderliche Plasmide für EBOV Minigenom-Assay.

Im Gegensatz zum Marburg-Virus-spezifischen Minigenom-Assay ist die Menge der benötigten Plasmid-DNA geringer (Tabelle 3). Optional kann auch hier eine Firefly Luziferase zu Normalisierungszwecken mitgeführt werden. Die Versuchsdurchführung erfolgt, wie unter 3.4.2 beschrieben.

3.4.4. Infektion von humanen Zellen mit Marburg-Virus Musoke

Experimentelle Infektionen mit Marburg-Virus erfolgen unter BSL4-Bedingungen, wobei alle BSL4-Arbeiten von Dr. Verena Krähling durchgeführt werden.

Huh7 Zellen, HAP1 oder HAP1-Knockout Zellen werden 1 Tag vor der Infektion im 6-Well Format ggf. mit Deckgläschen ausgesät (3.2.3). Am nächsten Tag erfolgt die Infektion mit MARV Musoke. Dazu wird eine Virussuspension der gewünschten MOI (= *Multiplicity of Infection*, Zahlenverhältnis von Viren zu Zielzellen) in Medium ohne FBS, DMEM++0% (2.9) angesetzt. Anschließend wird das Medium gegen das Virushaltige Medium getauscht. Die Zellen werden 1 h mit 1 ml Virussuspension bei 37 °C inkubiert. Danach wird das Inokulum abgenommen und es werden 2 ml DMEM++2% hinzugegeben. Das restliche Virus wird inaktiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgt je nach Versuchsplanung, meist zwischen 1-7 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank. Zur weiteren Verwendung müssen die Proben bei der Probengewinnung oder im Anschluss inaktiviert werden. Zur Dokumentation werden zunächst mikroskopische Aufnahmen des Zellrasens der jeweiligen Probe angefertigt. Im nächsten Schritt wird der Zellkulturüberstand abgenommen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 8000 rpm, 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Für die Aufreinigung viraler RNA aus dem Zellkulturüberstand werden 140 µl des Überstandes mit 560 µl AVL inklusive Carrier-RNA 15 sek durch Vortexen gemischt und 10 min inkubiert. Dann werden 560 µl 100 % Ethanol hinzugegeben und nochmals durch Vortexen gemischt. Durch den AVL Puffer und 100 % Ethanol werden vorhandene Viren inaktiviert. Die Proben können dann in neue Reaktionsgefäße transferiert und ausgeschleust werden. Im nächsten Schritt kann die weitere Aufreinigung der RNA aus den Proben mittels QIAamp viral RNA Kit erfolgen (3.1.4.4). Mit Hilfe einer filovirus-spezifischen qRT-PCR (3.1.3) kann dann die Zahl der Marburg-Virusgenome in den RNA-Proben quantitativ bestimmt werden.

Für die Herstellung von Proben für SDS-PAGE und Western Blot werden die Zellen in 1 ml PBS_{def} abgekratzt in ein Röhrchen überführt und bei 8000 rpm 4 °C für 10min abzentrifugiert. Die Pellets werden in 100 µl 1xPP resuspendiert und für 10 min bei 100 °C aufgekocht. Durch den Probenpuffer und das starke Erhitzen werden vorhandene Viren inaktiviert. Anschließend können auch diese Proben transferiert und ausgeschleust werden. Im nächsten Schritt kann die weitere Analyse der Proben in SDS-PAGE und Western Blot erfolgen (3.3.3, 3.3.4.).

4. Ergebnisse

4.1. Hefe-Zwei-Hybrid-Assay des MARV VP30 mit humaner cDNA Bibliothek

Das kommerziell erhältliche Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech) wurde verwendet, um neue Interaktionspartner für MARV VP30 zu identifizieren (3.2.1, 3.2.2). Nach der Klonierung des Gens für MARV VP30 in den Köder-Vektor pGBKT7 (Abbildung 12A) und der anschließenden Sequenzüberprüfung wurde die Expression des Fusionsproteins Gal4bdMARV_{myc}VP30 (Gal4-DNA-Bindedomäne, myc-Tag, MARV VP30) in Y2HGold Hefezellen verifiziert (Abbildung 12B, C). Eine Negativkontrolle von Hefezellen ohne überexprimiertes Protein, sowie ein Zelllysate VP30-exprimierender HEK293-Zellen und ein Überstand MARV-infizierter Zellen wurden als Positivkontrollen mitaufgetragen. In der Probe des Hefezelllysates mit Gal4bdMARV_{myc}VP30 zeigten sich 2 prominente Banden bei etwa 55 kDa und unterhalb von 36 kDa (Abbildung 12B). Mit Hilfe des ExPASy Molecular Weight Tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) und des ExPASy Translate Tools (<https://web.expasy.org/translate/>) wurde rechnerisch das Molekulargewicht des VP30-Fusionsproteins Gal4bdMARV_{myc}VP30 bestimmt. Dieses beträgt etwa 53 kDa, was die Vermutung nahelegt, dass die 55 kDa Bande dem gewünschten Gal4bdMARV_{myc}VP30 entspricht. Da die Laufhöhe der zweiten Bande verglichen mit den VP30 Banden in beiden Positivkontrollen deutlich geringer ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine unspezifische Bande handelt (Abbildung 12B). Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere Färbung mittels anti-myc Antikörper bestätigt (Abbildung 12C). Hier wurde sowohl Gal4bdMARV_{myc}VP30 als auch eine Positivkontrolle von Hefezellen, die das p53-Fusionsprotein Gal4bd_{myc}p53 (Gal4-DNA-Bindende Domäne, myc-Tag, p53) ektopisch exprimiert, detektiert. Die spezifisch angefärbte Bande des VP30-Fusionsproteins läuft hier ebenfalls bei etwa 55 kDa. Die exprimierenden Hefezellen konnten demnach für den weiteren Assay genutzt werden. Es folgte das *Mating* von Y2HGold Zellen, welche das VP30-Fusionsprotein exprimierten, mit Y187 Zellen, welche mit einer humanen cDNA Bibliothek transformiert waren (Mate and Plate Library Universal Human (Normalized)). Nach 24 h wurde ein Tropfen des Ansatzes im Lichtmikroskop analysiert (Abbildung 12D). Dabei zeigten vorliegende Zygoten von Hefezellen das erfolgreiche *Mating*. Die Zygoten bestehen dabei aus zwei haploiden Parentalzellen und einer diploiden Tochterzelle. Der Ansatz wurde auf Selektionsmedien ausplattiert (2.8, 3.2.2). Gewachsene Klone wurden noch einmal auf Selektionsmedien vermehrt. Die Plasmid-DNA der Hefezellen und damit auch die der möglichen Interaktionspartner wurde isoliert, in Bakterien vermehrt, aus diesen aufgereinigt und die Plasmide der Beute-Vektoren im Anschluss sequenziert. Die dabei gefundenen Interaktionspartner wurden auf das Vorliegen eines offenen, korrekten Leserahmens überprüft.

Um die Ergebnisse zu bestätigen und falsch positive Treffer auszuschließen wurde jeweils eine Kotransformation der Beuteplasmide mit dem VP30-Köderplasmid (pGBKT7-VP30), sowie eine Kotransformation mit leerem Köderplasmid durchgeführt (pGBKT7-leer) (Abbildung 12E). Nur wenn sich Wachstum in Gegenwart von VP30 zeigte und kein Wachstum in Abwesenheit von VP30 wurden die gefundenen Interaktionspartner als spezifisch angesehen. Der Hefe-Zwei-Hybrid-Assay wurde zweimal durchgeführt (Abbildung 12F). Es wurden insgesamt 5 neue Interaktionspartner für MARV VP30 identifiziert (Tabelle 4).

Name UniProt	Namensursprung	Gen
Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1	<i>SET domain bifurcated 1</i>	SETDB1
E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1	<i>HECT domain-containing protein 1</i>	HECTD1
E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	<i>Retinoblastoma-binding protein 6</i>	RBBP6
E3 SUMO-protein ligase PIAS2	<i>Protein inhibitor of activated STAT2</i>	PIAS2
E3 SUMO-protein ligase PIAS1	<i>Protein inhibitor of activated STAT protein 1</i>	PIAS1

Tabelle 4: Name, Namensursprung und verwendete Abkürzung der im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay für MARV VP30 gefundenen Interaktionspartner nach UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

Es handelt sich dabei, um 2 E3-Sumo-Ligasen, 2 Ubiquitin-Ligasen und 1 Histon-Methyltransferase und damit um Proteine, die vor allem regulatorische Funktionen in verschiedenen Signalkaskaden und auf Chromatinebene ausüben. Die Häufigkeit mit der die einzelnen Proteine gefunden wurden, war unterschiedlich. So wurden die Proteine SETDB1 und RBBP6 in beiden Versuchsdurchläufen gefunden, während die Proteine HECTD1, PIAS2 und PIAS1 lediglich im zweiten Durchlauf identifiziert werden konnten (Abbildung 12F).

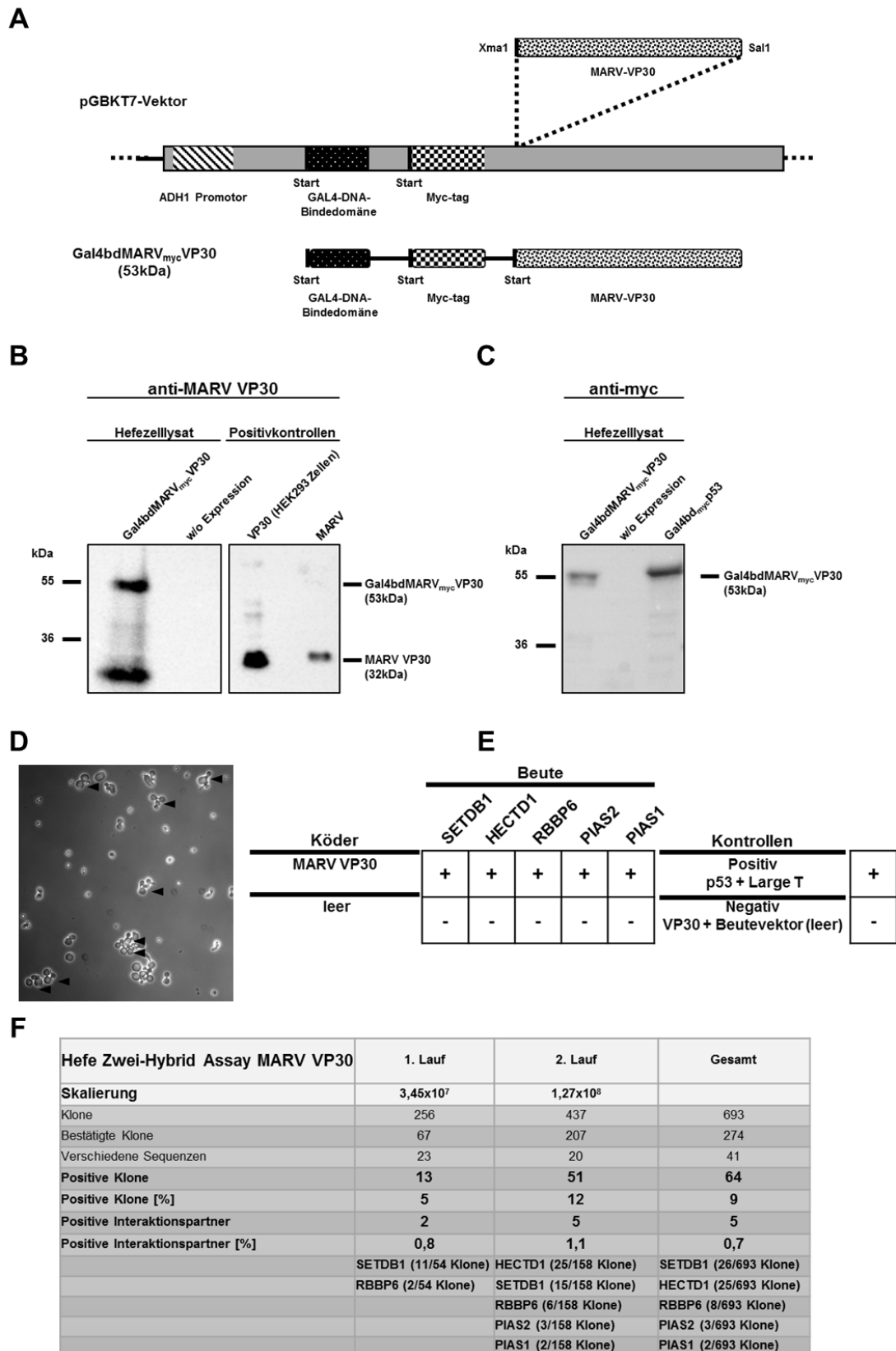


Abbildung 12: Klonierung, Expression und Analyse von MARV VP30 im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay.

(A) Klonierung von MARV VP30 in den Ködervektor pGBKT7 (Clontech). (B, C) Expression des MARV VP30-Fusionsproteins Gal4bdMARV_{myc}VP30 in Y2H Gold Hefezellen. Als Positivkontrollen dienen Lysate von HEK293 Zellen die VP30 exprimieren (48 h p.t.), sowie Überstände von MARV infizierten Huh7 Zellen MOI=1 (48 h p.l.). (D) *Mating* von Gal4bdMARV_{myc}VP30 exprimierenden Y2H Gold

Hefezellen mit Y187 Hefezellen, welche mit einer humanen cDNA Bibliothek transformiert waren. Gefundene Klone wurden wie unter 4.1 beschrieben analysiert. (E) Die Interaktionspartner wurden abschließend zusammen mit dem Gal4bdMARV_{myc}VP30 bzw. mit leerem Ködervektor in Y2H Gold Hefezellen kotransformiert. Als Positivkontrolle wurde die Kotransformation von p53 und Large T Antigen, als Negativkontrolle die Kotransformation von VP30 mit leerem Beutevektor mitgeführt. Die Ergebnisse sind tabellarisch dargestellt. Nur bei Wachstum der Klone in Anwesenheit von VP30 und fehlendem Wachstum in Abwesenheit von VP30 wurde die Interaktion als echt angesehen. (F) Statistische Auswertung der Hefe Zwei-Hybrid Analysen mit VP30. Angegeben sind die Skalierung (Gesamtzahl aller gescreenten Klone) und Daten zu den positiven Klonen.

4.2. Klonierung und Expression von PIAS1, PIAS2 und SETDB1

Für weitere Analysen wurden Expressionsplasmide für PIAS1, PIAS2 und SETDB1 benötigt. Expressionsplasmide für PIAS1 und PIAS2 konnten von Ke Shuai (Liu *et al.*, 1998; Arora *et al.*, 2003) über die Firma Addgene (<https://www.addgene.org/>) bezogen werden. Es handelte sich dabei um murines PIAS1 (mPIAS1), sowie humanes PIAS2 α , und PIAS2 β , zwei Isoformen von PIAS2, von denen PIAS2 β die längere Isoform ist. Die Sequenz der erhaltenen Konstrukte wurde überprüft und die Gene in den Vektor pCAGGS subkloniert. Dabei wurde mittels rekombinanter PCR N-terminal ein Flag-Tag oder ein HA-Tag eingefügt (3.1.1.). Anschließend wurden die Plasmide vervielfältigt (3.1.12) und die korrekten Sequenzen mittels Sequenzierung überprüft. Für die Herstellung eines SETDB1 Expressionsplasmids wurde RNA aus Huh7 Zellen aufgereinigt und durch Reverse Transkription cDNA erzeugt (3.1.4.3, 3.1.2). Mittels rekombinanter PCR wurden zwei Fragmente des SETDB1 erzeugt, die spezifische DNA vervielfältigt und N-terminal ein Flag- oder ein HA-Tag eingefügt. Darüber hinaus wurden Restriktionsschnittstellen für die weitere Klonierung eingefügt. Die so erzeugten Fragmente wurden nach dem Verdau durch geeignete Restriktionsendonukleasen in den Vektor pCAGGS ligiert, in Bakterien transformiert, vervielfältigt und die Sequenz überprüft. Nach erfolgreicher Klonierung von Flag-mPIAS1 , $\text{Flag-PIAS2}\alpha$, $\text{Flag-PIAS2}\beta$ und Flag-SETDB1 in den Vektor pCAGGS wurde die Expression der Plasmide in humanen Zellen getestet (Abbildung 13). HEK293 Zellen wurden ausgesät, transfiziert und mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert (3.3.3, 3.3.4). Es erfolgte eine Titration der jeweils transfizierten Plasmidmenge von 250 ng-2 μg (Abbildung 13A, C, E, G). Im Western Blot zeigte sich nach 48 h eine konzentrationsabhängige Expression aller Proteine (Abbildung 13). Auch schon 24 h nach der Transfektion war eine deutliche Expression zu sehen (Daten nicht gezeigt). Die erwarteten Laufhöhen der unterschiedlichen PIAS-Proteine (Flag-mPIAS1 69 kDa, $\text{Flag-PIAS2}\alpha$ 64 kDa, $\text{Flag-PIAS2}\beta$ 73 kDa) stimmten dabei mit den beobachteten Laufhöhen der Proteine überein (Abbildung 13A, C, E). $\text{Flag-PIAS2}\beta$ zeigte eine etwas höhere Laufhöhe als Flag-mPIAS1 , wie dies auch in anderen Publikationen beschrieben wird (Wang *et al.*, 2017).

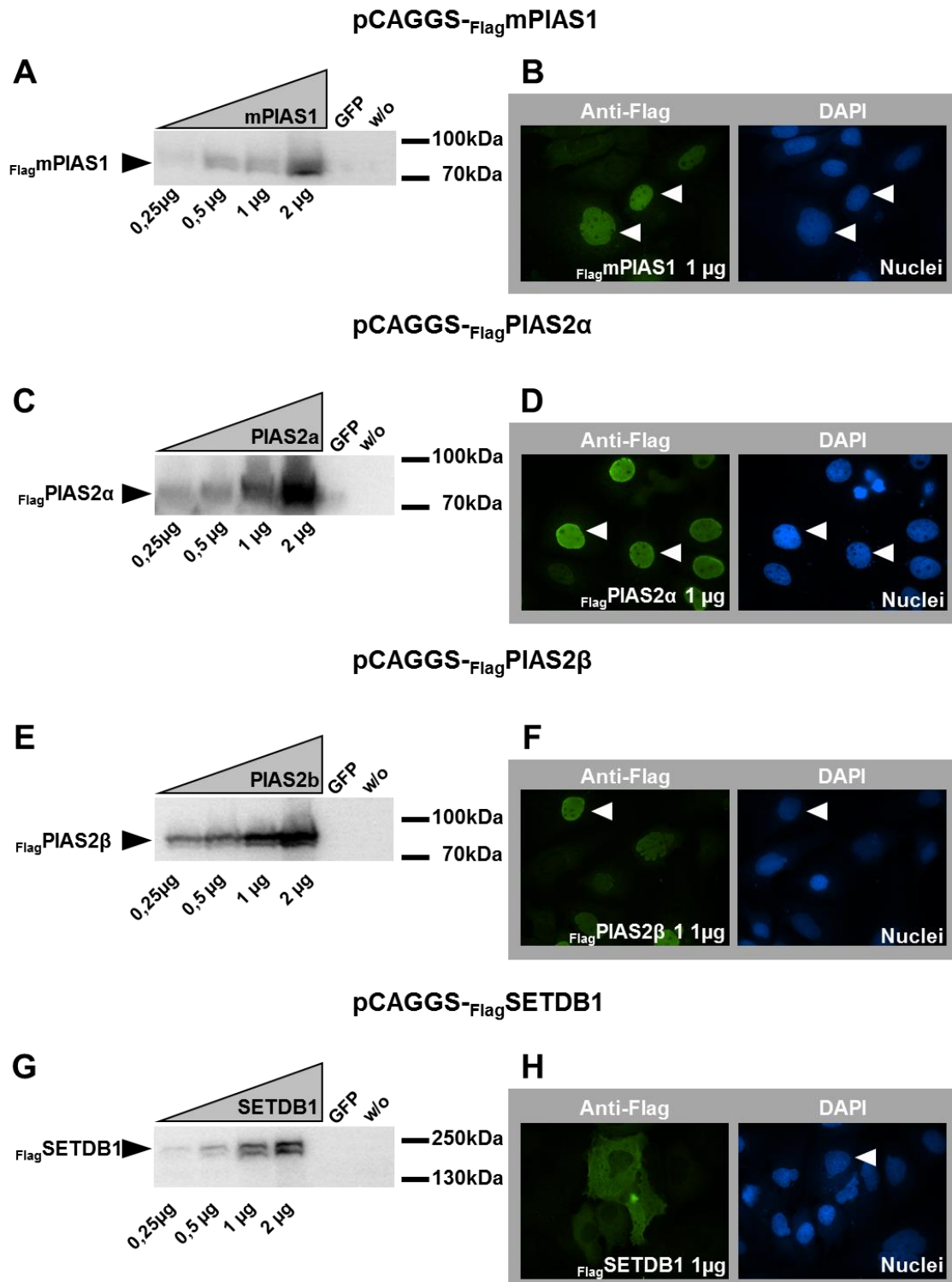


Abbildung 13: Expression und Lokalisation von FlagmPIAS1 , $\text{FlagPIAS2}\alpha$, $\text{FlagPIAS2}\beta$ und FlagSETDB1 in humanen Zellen.

HEK293 Zellen (A, C, E, G) und Huh7 Zellen (B, D, F, H) wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und 48 h später mittels Western Blot (HEK293) oder Immunfluoreszenz (Huh7) analysiert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Ernte der Zellen. Proben aus HEK293 Zellen wurden SDS-PAGE und Western Blot unterzogen (3.3.3, 3.3.4). Die Färbung erfolgte jeweils mit einem anti-Flag Primärantikörper. Als Sekundärantikörper wurde im Western Blot ein Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper aus dem Schwein und für die Immunfluoreszenz ein Alexa488 gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege verwendet. Eine DAPI-Färbung dient der Darstellung der Zellkerne in der Immunfluoreszenz. Pfeilspitzen zeigen Färbung der Zellkerne. Aufnahmen wurden mit dem

Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss) erstellt. (A, B) *Flag*mPIAS1. (C, D) *Flag*PIAS2 α . (E, F) *Flag*PIAS2 β . (G, H) *Flag*SETDB1.

Für *Flag*SETDB1, bei dem die rechnerische Laufhöhe etwa 144 kDa beträgt, wurde eine Doppelbande auf der erwarteten Laufhöhe von etwa 180 kDa beobachtet, wie dies in der Literatur beschrieben ist (Abbildung 13, G) (Schultz *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Das erhöhte Molekulargewicht geht dabei wahrscheinlich auf eine Phosphorylierung zurück. Bei der Bande mit dem geringeren Molekulargewicht handelt es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt (Schultz *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

Zur Bestimmung der Lokalisation der Proteine in der Zelle wurden Huh7 Zellen für Immunfluoreszenzanalysen ausgesät und mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert (Abbildung 13B, D, F, G). 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Ernte der Zellen und die weitere Analyse der Proben (3.3.5.). Bei allen PIAS-Proteinen zeigte sich eine Lokalisation im Zellkern (Abbildung 13B, D, F). Dies stimmt mit Beschreibungen in der Literatur überein (Miyauchi *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

Für SETDB1 ist eine Lokalisation des Proteins im Zellkern beschrieben (Schultz *et al.*, 2002). Die Kernlokalisation konnte in der vorliegenden Arbeit durch Überexpression von SETDB1 in Huh7 Zellen nicht bestätigt werden (Abbildung 13G). Stattdessen lag SETDB1 hauptsächlich im Zytoplasma vor. Ursache dieser Lokalisation scheint die Überexpression des Proteins zu sein, die zu einer Akkumulation des Proteins im Zytoplasma führt (Cho, Park and Kang, 2013). Der Eintritt von SETDB1 in den Kern scheint streng reguliert zu sein (Cho, Park and Kang, 2013). Auch ein Export von überschüssigem SETDB1 und Proteasom-regulierter Abbau von SETDB1 scheinen eine Rolle für die Detektion von SETDB1 im Zytoplasma zu spielen (Cho, Park and Kang, 2013; Tachibana *et al.*, 2015).

4.3. Ko-Immunpräzipitationsanalysen von VP30 mit PIAS1, PIAS2 und SETDB1

Zur Verifizierung der im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay gefundenen Interaktionen des MARV VP30 mit PIAS1, PIAS2 und SETDB1 wurden Ko-Immunpräzipitationen (KoIPs) von VP30 mit den jeweiligen Proteinen durchgeführt (3.2.5) (Abbildung 14). Diese wurden in HEK293 Zellen (Abbildung 14A, C, E) und in Huh7 Zellen (Abbildung 14B, D, F) erstellt. Abbildung 14A zeigt KoIPs von *HA*VP30 mit *Flag*mPIAS1, *Flag*PIAS2 α , *Flag*PIAS2 β und *Flag*SETDB1. Es wurde jeweils 1 μ g Expressionsplasmid je Konstrukt transfiziert. Als Kontrollen dienten ein Ansatz ohne Expressionsplasmid, sowie als Negativkontrolle *HA*VP30 ohne weiteres Expressionsplasmid. Die Präzipitation erfolgte durch Bindung der Flag-Tags der Proteine über eine anti-Flag-Agarose.

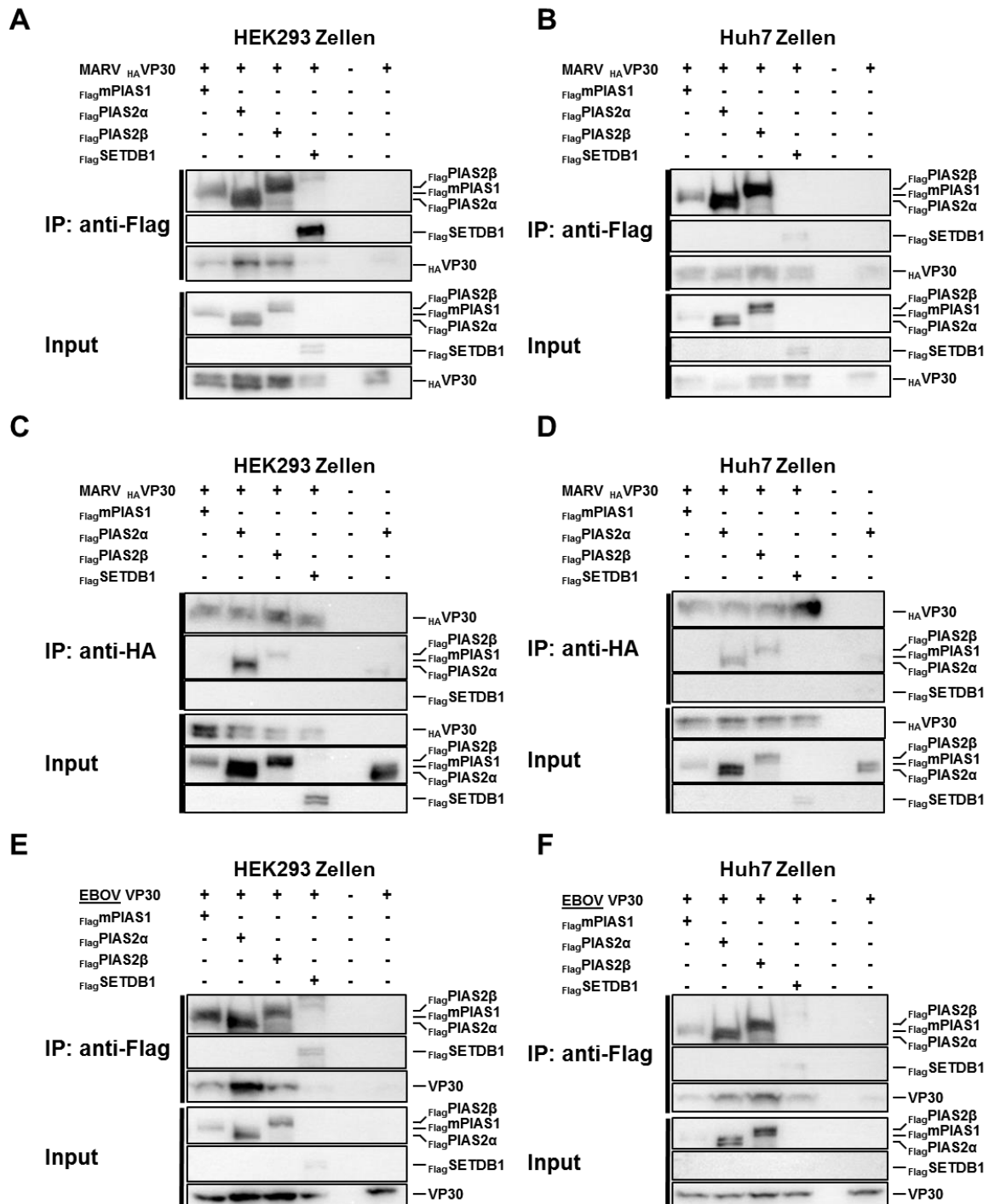


Abbildung 14: KoIP-Analysen zur Interaktion von PIAS1, PIAS2 mit MARV oder EBOV VP30.

(A, B) KoIP Analysen des MARV_{HA}VP30. HEK293 Zellen (A) oder Huh7 Zellen (B) wurden mit 1 µg Plasmid, kodierend für HA-VP30 und Flag^mPIAS1, Flag^mPIAS2α, Flag^mPIAS2β oder Flag^mSETDB1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer KoIP Analyse unterzogen. Zur Kontrolle der Proteinexpression (Input) wurde ein Aliquot aus den Zelllysaten entnommen. Das übrige Zelllysate wurde der Immunpräzipitation (IP) mittels Maus anti-Flag M2 Agarose für 2 h bei 4° C unterzogen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Färbung und Analyse erfolgte mit einem Kaninchen anti-Flag oder einem Kaninchen anti-HA Primärantikörper, gefolgt von einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper und der chemilumineszenzbasierten Detektion unter Verwendung des Chemidoc XRS Systems. (C, D) Vorgehen wie unter A beschrieben, außer der Präzipitation, die mittels anti-HA Agarose erfolgte (D, E) KoIP Analysen des EBOV VP30. Vorgehen wie unter A beschrieben. EBOV VP30 wurde durch Färbung mit einem Kaninchen anti-EBOV VP30

Primärantikörper und einem anti-Kaninchen Meerrettich-Peroxidase Antikörper nachgewiesen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des Chemidoc XRS Systems.

Die Analyse des Ausgangsmaterials vor der Präzipitation zeigte eine deutliche Expression aller Proteine in den Zelllysaten (Abbildung 14A, Input). Nach der Immunpräzipitation (Abbildung 14A, IP) zeigte sich sowohl bei $\text{Flag}^{\text{mPIAS1}}$, wie auch bei $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$ und $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ eine deutliche Bande für HA^{VP30} , welche in der Negativkontrolle nicht oder nur deutlich schwächer zu beobachten war. Somit konnte eine spezifische Interaktion von HA^{VP30} mit den PIAS Proteinen bestätigt werden. $\text{Flag}^{\text{SETDB1}}$ schien nicht mit HA^{VP30} zu interagieren. Die Ergebnisse wurden in Huh7 Zellen bestätigt (Abbildung 14B).

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob sich die gefundene Interaktion auch durch Präzipitation von HA^{VP30} nachweisen lässt (Abbildung 14C, D). Zu diesem Zweck wurde HA^{VP30} verwendet und dieses mittels anti-HA-Agarose präzipitiert (Abbildung 14C, IP). Hier wurde als Negativkontrolle $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$ mitgeführt. Auch hier zeigte sich eine Ko-Präzipitation von $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$ und $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ (Abbildung 14C, IP), während sie für $\text{Flag}^{\text{mPIAS1}}$ nicht oder nur schwach beobachtet werden konnte. Eine Interaktion von $\text{HA}^{\text{MARV VP30}}$ mit $\text{Flag}^{\text{SETDB1}}$ wurde nicht gefunden. Die Ergebnisse wurden in Huh7 Zellen bestätigt (Abbildung 14D).

Im Folgenden wurde mittels KoIP analysiert, ob auch eine Interaktion des EBOV VP30 mit PIAS1, PIAS2 und SETDB1 nachgewiesen werden kann (Abbildung 14E, F). Die Präzipitation erfolgte mittels anti-Flag-Agarose. Es zeigte sich eine deutliche Ko-Präzipitation des EBOV VP30 mit $\text{Flag}^{\text{mPIAS1}}$, $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$ und $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ (Abbildung 14, IP). Für EBOV VP30 konnte eine Interaktion mit $\text{Flag}^{\text{SETDB1}}$ gezeigt werden, allerdings nur in Huh7 Zellen (Abbildung 14F). Zusammenfassend wurde eine Interaktion von MARV und EBOV VP30 mit $\text{Flag}^{\text{mPIAS1}}$, $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$ und $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ bestätigt.

4.4. Eingrenzung und Charakterisierung der Bindungsstelle von PIAS2 β auf MARV VP30

Die Proteine mPIAS1 , $\text{PIAS2}\alpha$ und $\text{PIAS2}\beta$ zeigten in den vorangegangenen KoIP Analysen eine deutliche Interaktion mit VP30 (4.3). Um die genaue Interaktionsstelle der PIAS Proteine auf dem VP30 näher zu charakterisieren wurden KoIP-Analysen mit HA^{VP30} Deletionsmutanten durchgeführt (Klonierung, Cornelius Rohde, AG Becker, Institut für Virologie Marburg). Die Familie der PIAS Proteine (PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4) zeigt eine signifikante Homologie von mehr als 50% (Liu *et al.*, 1998; Shuai and Liu, 2005). Bei PIAS2 stellt $\text{PIAS2}\beta$ die längere Isoform dar. Daher wurde hier stellvertretend für mPIAS1 und PIAS2 die Interaktion von $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ mit den HA^{VP30} Deletionsmutanten analysiert.

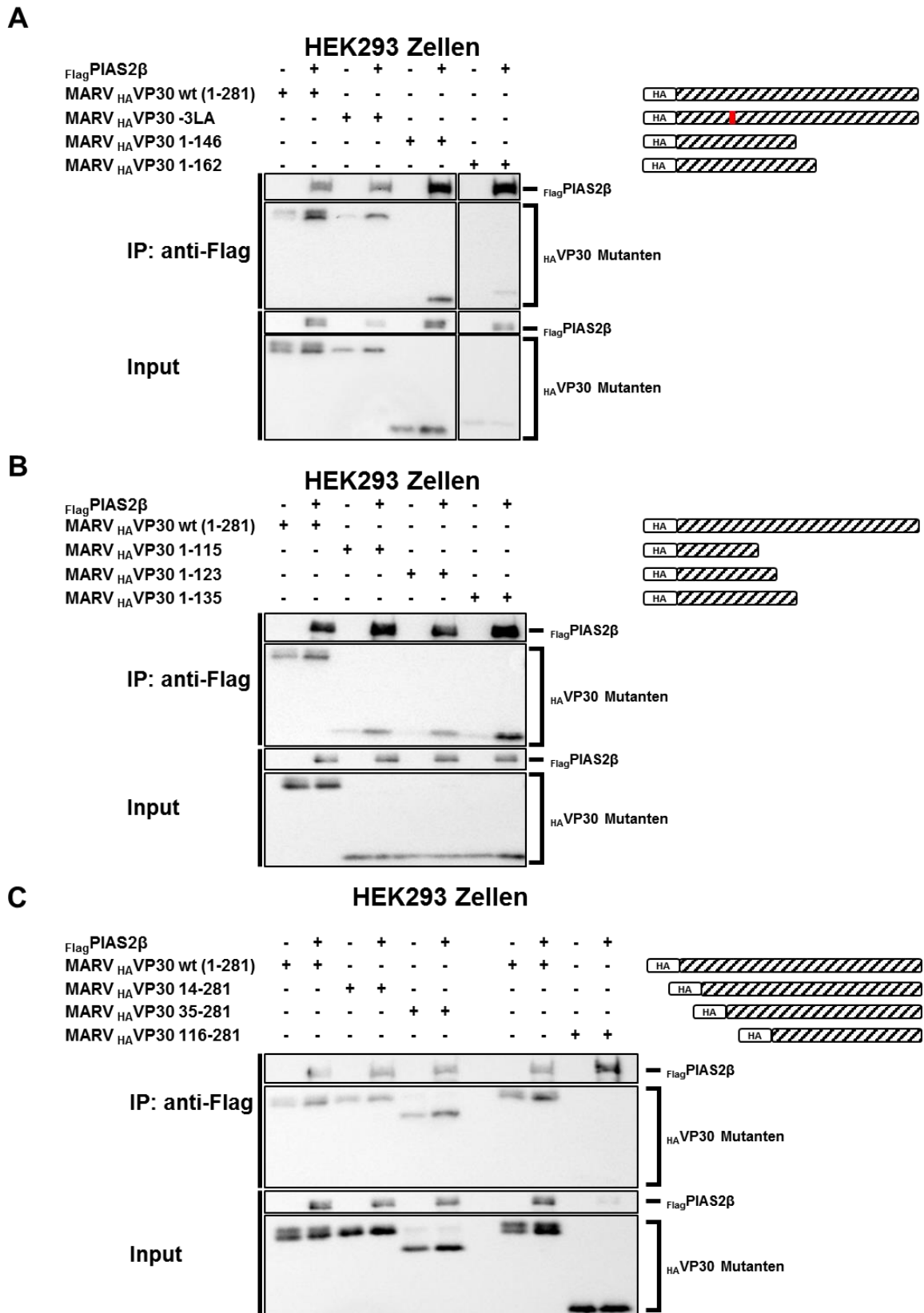


Abbildung 15: KoIP-Analysen zur Charakterisierung der Bindungsstelle des MARV VP30 für PIAS2β. KoIP-Analysen von verschiedenen VP30 Mutanten in Gegenwart und Abwesenheit von PIAS2β. HEK293 Zellen wurden mit 1 µg Plasmid, kodierend für _{HA}VP30 oder die jeweilige _{HA}VP30-Mutante und Flag^{mPIAS1}, Flag^{PIAS2α}, Flag^{PIAS2β} oder Flag^{SETDB1} transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die

Zellen lysiert und einer KoIP Analyse unterzogen, wie unter Abbildung 14 beschrieben. Linke Seite zeigt Ko-IP, rechte Seite zeigt Position der Deletion/Mutation (Rotes Kästchen)

(A) KoIP-Analyse von FlagPIAS2 β mit MARV HA-VP30 oder HA-VP30 Mutanten. HA-VP30 Mutanten: HA-VP30-3LA (Homooligomerisierungsdomäne mutiert, AS 106-108 mutiert von L \rightarrow A, (L106-108A)), HA-VP30 1-146 (AS 147-281 deletiert), HA-VP30 1-162 (AS 163-281 deletiert). (B) KoIP-Analysen von C-terminalen HA-VP30 Deletionsmutanten in Gegenwart und Abwesenheit von FlagPIAS2 β . Vorgehen wie unter A beschrieben. HA-VP30 Mutanten: HA-VP30 1-115 (AS 116-281 deletiert), HA-VP30 1-123 (AS 124-281 deletiert), HA-VP30 1-135 (AS 136-281 deletiert). (C) KoIP-Analysen von N-terminalen HA-VP30 Deletionsmutanten in Gegenwart und Abwesenheit von FlagPIAS2 β . Vorgehen wie unter A beschrieben. HA-VP30 Mutanten: HA-VP30 14-281 (AS 1-13 deletiert), HA-VP30 35-281 (AS 1-34 deletiert), HA-VP30 116-281 (AS 1-115 deletiert). Abweichend von A wurden 3 μ g Plasmid von HA-VP30 116-281 und 3 μ g HA-VP30 als Kontrolle transfiziert (C, rechte Seite).

Für die KoIP Analysen wurde FlagPIAS2 β zusammen mit HA-VP30 oder der jeweiligen Mutante von HA-VP30 koexprimiert (3.2.5). Es folgte eine Präzipitation mittels anti-Flag-Agarose. Zunächst wurden eine monomere VP30-Mutante (HA-VP30-3LA) (Hartlieb *et al.*, 2003), sowie C-terminale Deletionsmutanten (HA-VP30 1-146 und HA-VP30 1-162) getestet (Abbildung 15A). Es zeigte sich, dass alle Mutanten ko-präzipitiert wurden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Aminosäuren 147-281 und die Homooligomerisierungsdomäne nicht an der Interaktion mit PIAS2 β beteiligt sind.

Um die Interaktionsstelle weiter einzugrenzen wurden weitere KoIP-Analysen mit N- und C-terminalen Deletionsmutanten von HA-VP30 durchgeführt (Abbildung 15B, C). Zunächst wurden C-terminale Deletionsmutanten getestet, bei denen noch die Aminosäuren 1-115 (HA-VP30 1-115), 1-123 (HA-VP30 1-123) und 1-135 (HA-VP30 1-135) vorhanden waren (Abbildung 15B). Auch hier konnte für alle Deletionsmutanten eine Interaktion mit PIAS2 β nachgewiesen werden. Somit scheinen auch die Aminosäuren 116-146 nicht wichtig für die Interaktion mit VP30 zu sein.

Aus diesem Grund wurden nun C-terminale Deletionsmutanten getestet, bei denen die Aminosäuren 14-281 (HA-VP30 14-281), 35-281 (HA-VP30 35-281) und 116-281 (HA-VP30 116-281) vorhanden sind (Abbildung 15C). Es zeigte sich, dass nur bei den Mutanten HA-VP30 14-281 und HA-VP30 35-281 eine Kopräzipitation mit PIAS2 β nachgewiesen werden konnte. Bei der Mutante HA-VP30 116-281 hingegen konnte keine Kopräzipitation und folglich keine Interaktion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Bindungsstelle des VP30 für PIAS2 β vermutlich innerhalb der Aminosäuren 35-116 liegt.

4.5. Immunfluoreszenzanalysen zur Bestimmung der Lokalisation der Interaktion von VP30 und PIAS2 β

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass MARV VP30 und PIAS2 β miteinander interagieren. Da für VP30 bisher vor allem eine cytoplasmatische Lokalisation in Einschlusskörpern beschrieben ist (Becker *et al.*, 1998; Modrof *et al.*, 2002) und die PIAS Proteine vor allem im Zellkern zu finden sind (Miyauchi *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2003), stellte sich die Frage, wie die intrazelluläre Lokalisation einer solchen Interaktion aussehen kann. Um diese Frage zu beantworten wurden indirekte Immunfluoreszenzanalysen von $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ mit MARV VP30 durchgeführt (3.3.5). Zu diesem Zweck wurden Huh7 Zellen ausgesät und mit je 1 μg Expressionsplasmid für MARV VP30, NP und $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert. Der Einfluss von MARV NP wurde getestet, da es in der Lage ist VP30 zu binden und dieses in MARV-spezifische Einschlusskörper zu rekrutieren (Becker *et al.*, 1998). Bei einer Bindung von PIAS2 β an VP30 und von VP30 an NP könnte PIAS2 β ebenfalls in Einschlusskörper lokalisieren. 48 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen einer indirekten konfokalen Immunfluoreszenzanalyse unterzogen (3.3.5) (Abbildung 16).

Es bestätigte sich, dass $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ bei alleiniger Überexpression vor allem im Zellkern zu finden ist (Abbildung 16A), wie dies auch in der Einzelexpression (Abbildung 13) der Fall war und in der Literatur beschrieben ist (Miyauchi *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2003). Bei Koexpression von MARV VP30 war zu beobachten, dass $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ und MARV VP30 in einigen Zellen zusammen im Zellkern zu finden waren (Abbildung 16B). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Koexpression von MARV NP und $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ (Abbildung 16C). Auch hier war MARV NP zum Teil im Zellkern zu finden. Interessanterweise konnten MARV VP30 und MARV NP auch unabhängig von PIAS2 β im Zellkern beobachtet werden (nicht gezeigt), was bisher nicht in der Literatur beschrieben ist. In MARV NP induzierten Einschlusskörpern war keine Lokalisation von PIAS2 β zu beobachten.

Bei Koexpression von MARV VP30, NP und PIAS2 β konnte, wie erwartet, eine NP-vermittelte Bildung von Einschlusskörpern beobachtet werden, in welche auch VP30 rekrutiert wurde (Abbildung 16D). Eine Rekrutierung von $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ in Einschlusskörper wurde nicht beobachtet. Die Koexpression von VP30 und NP zeigte die erwartete Kolokalisation von NP und VP30 in Einschlusskörpern (Abbildung 16E).

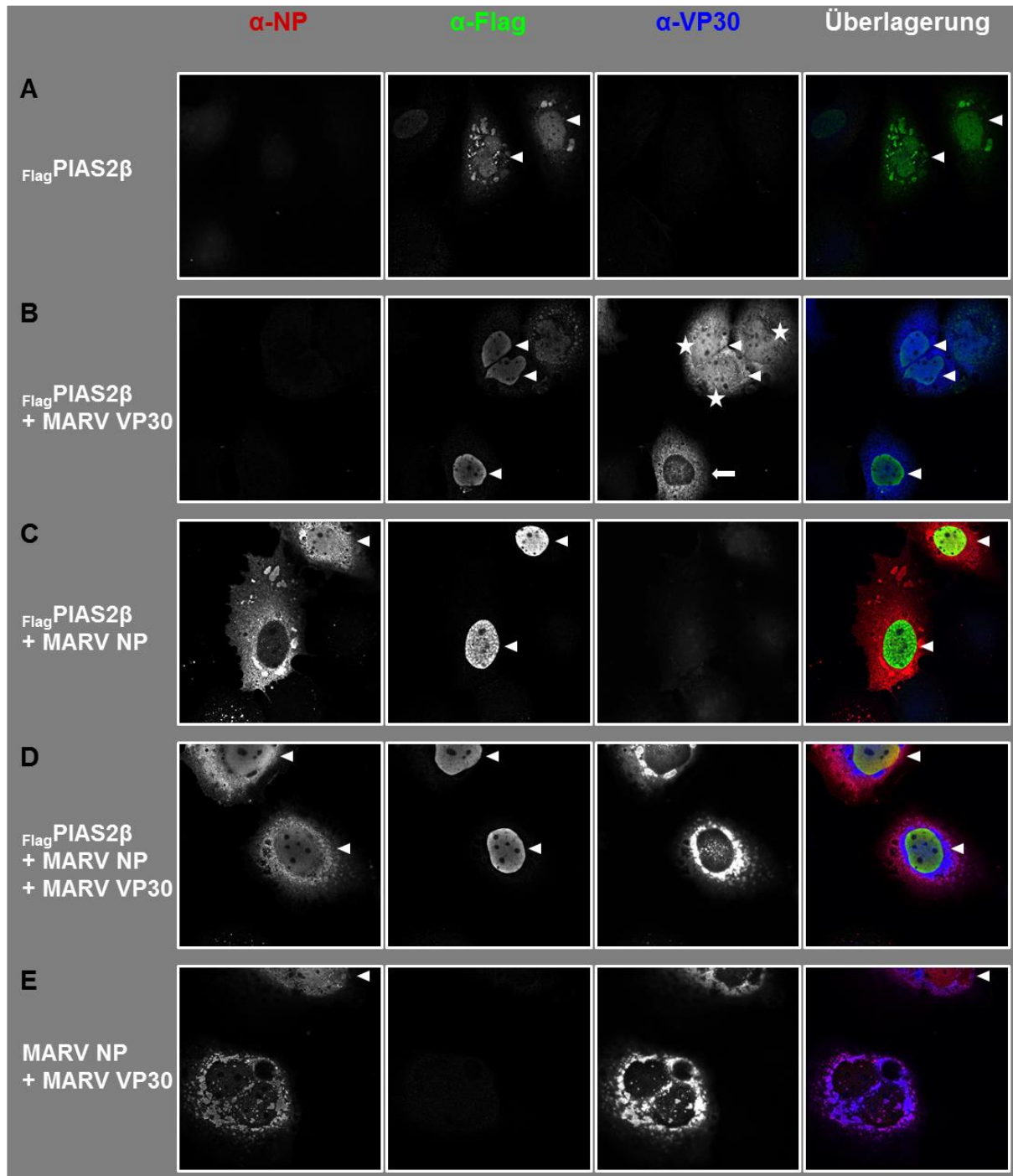


Abbildung 16: Immunfluoreszenzanalysen von MARV VP30, NP und PIAS2β.

Huh7 Zellen wurden mit je 1 µg Expressionsplasmid des MARV VP30, MARV NP und $\text{FlagPIAS2}\beta$ transfiziert (3.3.5). Die Plasmid-Gesamtmenge wurde durch die Verwendung von entsprechenden Mengen Leervektor in allen Ansätzen gleich gehalten. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Färbung von $\text{FlagPIAS2}\beta$ mittels Kaninchen anti-Flag Primärantikörper und Ziege anti-Kaninchen Alexa488 Sekundärantikörper. MARV NP wurde mittels Meerschwein anti-NP Primärantikörper und Ziege anti-Meerschwein Alexa 594 Sekundärantikörper gefärbt. Die Färbung von VP30 erfolgte mit Maus anti-VP30 Primärantikörper und Ziege anti-Maus Marina Blue Sekundärantikörper. Konfokale Bilder wurden erstellt mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops TCS SP5 2 (Leica), die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ 1.49s. Pfeilspitzen zeigen Lokalisation im Zellkern, Sterne zeigen Färbung von MARV VP30 im Zellkern, Pfeile zeigen Färbungen von MARV VP30 im Zytoplasma.

Um die Lokalisation von $\text{FlagPIAS2}\beta$ und VP30 genauer zu untersuchen wurde eine quantitative Kolokalisationsanalyse (Abbildung 17) einiger Zellen der Proben von $\text{FlagPIAS2}\beta$ +VP30 (Abbildung 16B), NP+VP30 (Abbildung 16E), sowie $\text{FlagPIAS2}\beta$ +NP+VP30 (Abbildung 16D) mit Hilfe des Coloc2 Plugins für ImageJ durchgeführt. Als Maß wurde der *Pearson correlation coefficient* (PCC) bestimmt, der die lineare Korrelation zweier Variablen angibt. Der PCC kann dabei Werte zwischen 1 (totale positive Korrelation), 0 (Keine, zufällige Korrelation) und -1 (totale negative Korrelation bzw. Exklusion) annehmen. Im Fall der Immunfluoreszenzanalyse wird die Korrelation der einzelnen Pixel in zwei miteinander zu vergleichenden Kanälen bestimmt, um basierend auf diesen Pixel-Korrelationen eine Aussage zum Ausmaß der Kolokalisation zu treffen (Dunn, Kamocka and McDonald, 2011).

Der Ansatz von NP+VP30 diente als Positivkontrolle für Kolokalisation, da für diese eine Interaktion und Kolokalisation bereits bekannt ist (Becker *et al.*, 1998). Bei Messung des PCC für NP und VP30 zeigte sich ein mittlerer Wert von $r = 0,745$ was auf eine starke Korrelation hindeutet.

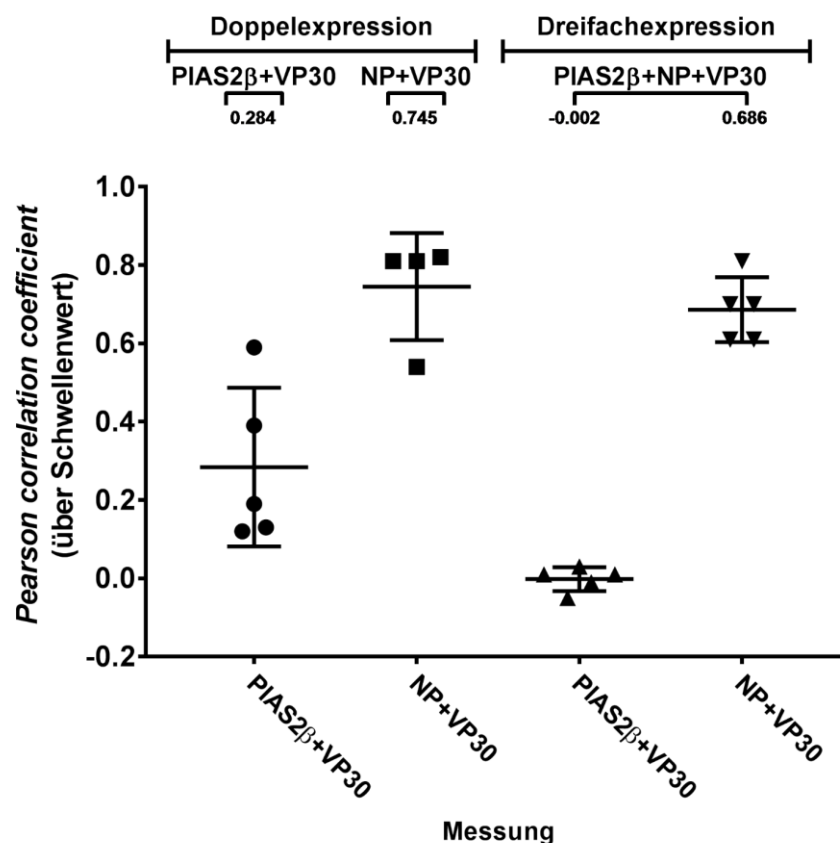


Abbildung 17: Kolokalisationsanalyse von PIAS2 β und VP30 mittels *Pearson correlation coefficient*.

Analyse der Proben aus Abbildung 16. Konfokale Immunfluoreszenzbilder der Proben PIAS2 β +VP30, NP+VP30, sowie PIAS2 β +NP+VP30 wurden mit Hilfe des Coloc2 Plugins für ImageJ analysiert. Dazu wurden für 4-5 Zellen die Zellgrenzen markiert und die Korrelation der auf der X-Achse angegebenen Kanäle durchgeführt. Die PCC-Werte (über Schwellenwert) je Zelle sind aufgetragen.

Im Ansatz mit $\text{FlagPIAS2}\beta$ +VP30 zeigte sich bei Messung von $\text{FlagPIAS2}\beta$ und VP30 ein mittlerer PCC von $r = 0,284$, was auf eine schwächere Korrelation deutet. Dabei konnte in Zellen, in denen VP30 im Zellkern zu finden war, ein höherer PCC gemessen werden (z. B.: $r = 0,39$; $0,59$) als bei Zellen, in denen VP30 lediglich im Zytoplasma zu finden war (z. B.: $r = 0,12$; $0,13$). Darüber hinaus wurden auch die Kolokalisationen von PIAS2 β und VP30, sowie von NP und VP30 im Ansatz mit PIAS2 β +NP+VP30 gemessen. Dabei zeigte sich für NP+VP30 wiederum ein hoher PCC von $r = 0,686$, während bei Messung von PIAS2 β und VP30 der PCC $r = -0,002$ betrug. Entsprechend lag hier, in Gegenwart von NP, keine Korrelation von PIAS2 β und VP30 vor.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwischen PIAS2 β und VP30 eine Kolokalisation besteht, möglicherweise bevorzugt im Zellkern. In Gegenwart von NP zeigt sich hingegen keine Kolokalisation von PIAS2 β und VP30.

4.6. Charakterisierung der anti-Interferon-Wirkung der PIAS-Proteine und SETDB1

Für verschiedene PIAS-Proteine ist eine inhibitorische Wirkung auf verschiedene STAT-Proteine und die Interferon-Antwort beschrieben (Liu *et al.*, 1998, 2004; Arora *et al.*, 2003; Rogers, Horvath and Matunis, 2003; Ungureanu *et al.*, 2003). Dieser Sachverhalt kann auch während einer Virusinfektion eine zentrale Rolle spielen, da die Interferonantwort entscheidend an der antiviralen Antwort der Zelle beteiligt ist. Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob und in welchem Umfang die gefundenen Interaktionspartner von VP30 in der Lage sind die Interferon- β Signalkaskade zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde ein IFIT2-Firefly Luziferase Reporter-Assay verwendet (Abbildung 18)(Paulson *et al.*, 2002). Dieses System erlaubt es, die Interferon- β vermittelte Aktivierung des IFIT2-Promotors in Form der Firefly Luziferase Aktivität zu messen.

Die Durchführung erfolgte wie unter 3.3.6 und 3.3.7 beschrieben. Es wurden Expressionsplasmide für FlagmPIAS1 , $\text{FlagPIAS2}\alpha$, $\text{FlagPIAS2}\beta$ und FlagSETDB1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung der Zellen mit Interferon- β und nach weiteren 24 h die Ernte der Zellen und die Messung der Luziferase-Aktivität. Die Expressionskontrollen (Abbildung 18A) zeigten, dass mPIAS1, PIAS2 α , PIAS2 β und SETDB1 deutlich exprimiert wurden.

Im IFIT2-Luziferase Reporter-Assay (Abbildung 18B) zeigte sich, dass alle getesteten PIAS-Proteine, d. h. mPIAS1, wie auch PIAS2 α und PIAS2 β die durch Interferon- β vermittelte Signalkaskade sehr effizient inhibieren können, während SETDB1 dazu nicht in der Lage ist. In Gegenwart von SETDB1 wurde hingegen eine leichte Steigerung der Aktivität beobachtet. Diese Ergebnisse decken sich mit den veröffentlichten Beobachtungen zu PIAS1, welches in der Lage ist die Bindung von Phospho-STAT1 und damit die Aktivierung von STAT1-Zielgenen zu inhibieren (Liu *et al.*, 1998; Liao, Fu and Shuai, 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt für

mPIAS1, wie auch für PIAS2 α und PIAS2 β zum ersten Mal, dass diese die Aktivierung des IFIT2-Promotors hemmen. Darüber hinaus bestätigen diese Experimente, dass die exprimierten Proteine mPIAS1, PIAS2 α und PIAS2 β funktionell sind.

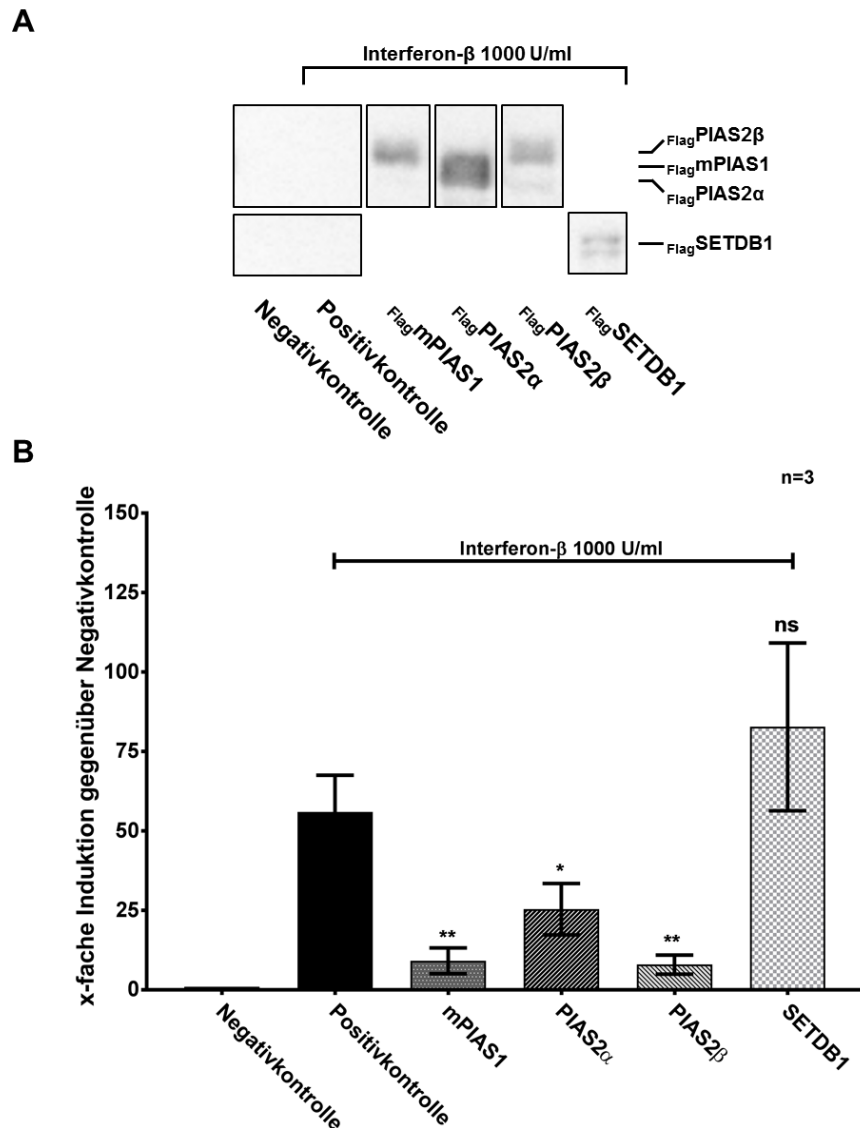


Abbildung 18: Hemmung der Interferon- β Antwort durch PIAS Proteine.

IFIT2-Assay in Gegenwart von mPIAS1, PIAS2 α , PIAS2 β und SETDB1. HEK293 Zellen wurden ausgesät und transfiziert, (3.2.3, 3.2.4, 3.3.6). Dazu wurden 0,5 μ g IFIT2-Firefly Reporter und zusätzlich je 1 μ g des jeweiligen Expressionsplasmids Flag-mPIAS1 , $\text{Flag-PIAS2}\alpha$, $\text{Flag-PIAS2}\beta$, und Flag-SETDB1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden alle Proben, außer der Negativkontrolle für 24 h mit 1000 U/ml Interferon- β behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und dem Luziferase-Assay unterzogen (3.3.6, 3.3.7). Aliquots der Proben wurden zur Kontrolle der Protein Expression mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wie in Abbildung 13 beschrieben. (A) Expressionskontrolle. (B) IFIT2 Luziferase-Assay. Es erfolgte keine Normalisierung. Die Negativkontrolle wurde auf 1 gesetzt und die x-fache Induktion des Reporters angegeben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD), One-Way ANOVA Analyse wurde durchgeführt mittels Dunnett's multiple comparison test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

4.7. Einfluss von PIAS1, PIAS2 und SETDB1 auf die filovirale Transkription und Replikation

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, welchen Einfluss die gefundenen Proteine auf die Funktion von VP30 als viraler Transkriptionsfaktor (1.1.5.5) haben. Zu diesem Zweck wurde die filovirale Transkription und Replikation mit Hilfe von MARV oder EBOV Minigenom-Assays analysiert (3.4.2., 3.4.3).

MARV und EBOV VP30 spielen eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktoren im filoviralen Replikationszyklus. Die Identität auf Proteinebene von MARV und EBOV VP30 beträgt etwa 34%. Bei Hemmung der MARV VP30 Expression durch RNA-Interferenz ist die virale Transkription und Replikation deutlich reduziert (Fowler *et al.*, 2005), während sie in Gegenwart von VP30 um das 2-3 fache gesteigert ist (Wenigenrath *et al.*, 2010). Außerdem ist MARV VP30 notwendig für die Herstellung von rekombinanten Viren (Enterlein *et al.*, 2006). EBOV VP30 ist essentiell für die virale Transkription. Die virale Transkription ist in Abwesenheit von VP30 fast vollständig inhibiert (Mühlberger *et al.*, 1998; Modrof *et al.*, 2002; Biedenkopf *et al.*, 2016; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016). Zudem wurde für EBOV VP30 gezeigt, dass es entscheidend an der Umschaltung von Transkription zu Replikation beteiligt ist und so indirekt auch eine Bedeutung für die Replikation hat (Biedenkopf *et al.*, 2016; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016).

Zunächst wurden die Proteine auf ihren Einfluss im MARV Minigenom-Assay hin analysiert (Abbildung 19A, B). Ein Ansatz mit allen notwendigen Plasmiden für das MARV Minigenom-Assay diente als Positivkontrolle. Ein Ansatz ohne die Polymerase L diente als Negativkontrolle. Zudem diente ein Ansatz ohne VP30 Expressionsplasmid, der Kontrolle von VP30 abhängigen Effekten. Es wurde eine Titration der Proteine $\text{Flag}^{\text{mPIAS1}}$, $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$ und $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$, sowie $\text{Flag}^{\text{SETDB1}}$ erstellt (200 ng, 500 ng und 1000 ng) (Abbildung 19A), die mittels SDS-PAGE/Western Blot überprüft wurde und eine mengenabhängige Expression zeigte.

Da die PIAS Proteine auch einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die zur Normalisierung eingesetzte Firefly-Luziferase hatten, wurde keine Normalisierung durchgeführt, sondern eine gleichmäßige Translation anhand der Tubulinexpression im Westernblot überprüft. Es ist gegenwärtig nicht bekannt, ob die IFN-Signalkaskade-inhibierende Wirkung oder die transkriptionsregulatorische Wirkung der PIAS Proteine die Translation der ektopischen Firefly-Luziferase beeinflussen. Zwar wurde eine transkriptionssteigernde Wirkung von PIAS1 auf HCMV-Promotoren (J.-M. Lee *et al.*, 2003) und von PIAS2 auf EBV-Promotoren (Liu *et al.*, 2006) beschrieben, eine solche Wirkung auf SV40 Promotoren, wie bei der hier verwendeten ektopischen Firefly-Luziferase ist jedoch bislang nicht bekannt. Ein solcher Effekt war nicht bei der Expression des endogenen Tubulin zu entdecken.

In Abwesenheit von VP30 war die Reporteraktivität, wie erwartet, deutlich auf etwa 50% Restaktivität verringert. Dies deckt sich mit Beobachtungen zur Titration von VP30 in VLP-Assays bei denen die Aktivität in Gegenwart von MARV VP30 2- bis 3-fach erhöht ist (Wenigenrath *et al.*, 2010). Bei Titration der PIAS-Proteine zeigte sich, dass alle getesteten PIAS Proteine in der Lage sind, eine dosisabhängige Steigerung der Reporteraktivität zu bewirken (Abbildung 19B), während SETDB1 keine signifikanten Effekte hatte. PIAS2 β zeigte den stärksten Effekt. Folglich stellte sich die Frage, ob die beobachteten Effekte abhängig von VP30 bzw. der VP30-PIAS-Interaktion sind.

In einem weiteren Versuch sollte daher getestet werden, welche Effekte ggf. bei Abwesenheit von VP30 beobachtet werden können (Abbildung 19C, D). Zu diesem Zweck wurde ein MARV Minigenom-Assay analog zum zuvor beschriebenen Versuch durchgeführt. Neben den bereits beschriebenen Kontrollen umfassten die Ansätze die Überexpression der PIAS-Proteine und SETDB1 mit und ohne VP30. Die Expressionskontrollen zeigten eine gleichmäßige Expression aller Proteine (Abbildung 19C). In Gegenwart von mPIAS1 bei Abwesenheit von VP30 zeigte sich ein deutlicher Verlust an Reporter Aktivität (Abbildung 19D), vergleichbar mit der -VP30 Kontrolle, d. h. hier scheint die Steigerung der Reporteraktivität VP30-abhängig zu sein. In den Ansätzen mit PIAS2 α und PIAS2 β war ein Rückgang der Reporteraktivität in Abwesenheit von VP30 nicht zu beobachten (Abbildung 19D). Hier zeigte sich auch in Abwesenheit von VP30 eine gegenüber der Positivkontrolle leicht erhöhte Reporteraktivität. Dies deutet darauf hin, dass PIAS2 möglicherweise in der Lage sein könnte, die Funktion von VP30 zu kompensieren.

Die für MARV VP30 gefundenen Effekte sollten daraufhin mit möglichen Effekten auf EBOV VP30 verglichen werden. Dazu wurden EBOV-spezifische Minigenom-Assays (3.4.3) durchgeführt (Abbildung 19E, F). Zusätzlich zu Positiv- und Negativkontrolle (-L) des Minigenom-Assays, erfolgte bei EBOV z.T. ein hybrid-kompensatorischer Ansatz, d. h. an Stelle von EBOV VP30 wurde MARV VP30 in einem hybriden EBOV Minigenom-Assay eingesetzt und dadurch das Fehlen von EBOV VP30 kompensiert. Dadurch sollten VP30-Effekte auf die Transkription und Replikation im EBOV Minigenom System besser untersucht werden können. Eine Kontrolle ohne VP30 wurde nicht angesetzt, da diese im Falle des EBOV Minigenom-Assays, nur minimale Aktivität zeigen würde (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999). Die Expressionskontrollen zeigten eine gleichmäßige Expression aller Proteine (Abbildung 19E). Im EBOV spezifischen Minigenom-Assay zeigte sich bei Koexpression von mPIAS1 eine signifikante Reduktion der Reporteraktivität im Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 19F), während in Gegenwart von PIAS2 und SETDB1 keine deutlichen Unterschiede beobachtet wurden. Im hybrid-kompensatorischen Ansatz mit MARV VP30 (Abbildung 19F) waren die gleichen Effekte wie im MARV spezifischen Minigenom-Assay (Abbildung 19B) zu beobachten. Hier zeigte sich in Gegenwart der PIAS Proteine eine Steigerung der

Reporteraktivität, während in Gegenwart von SETDB1 eher eine Reduktion der Reporteraktivität zu beobachten war. Dies spricht dafür, dass die PIAS-Proteine unterschiedliche Effekte abhängig von MARV oder EBOV VP30 ausüben.

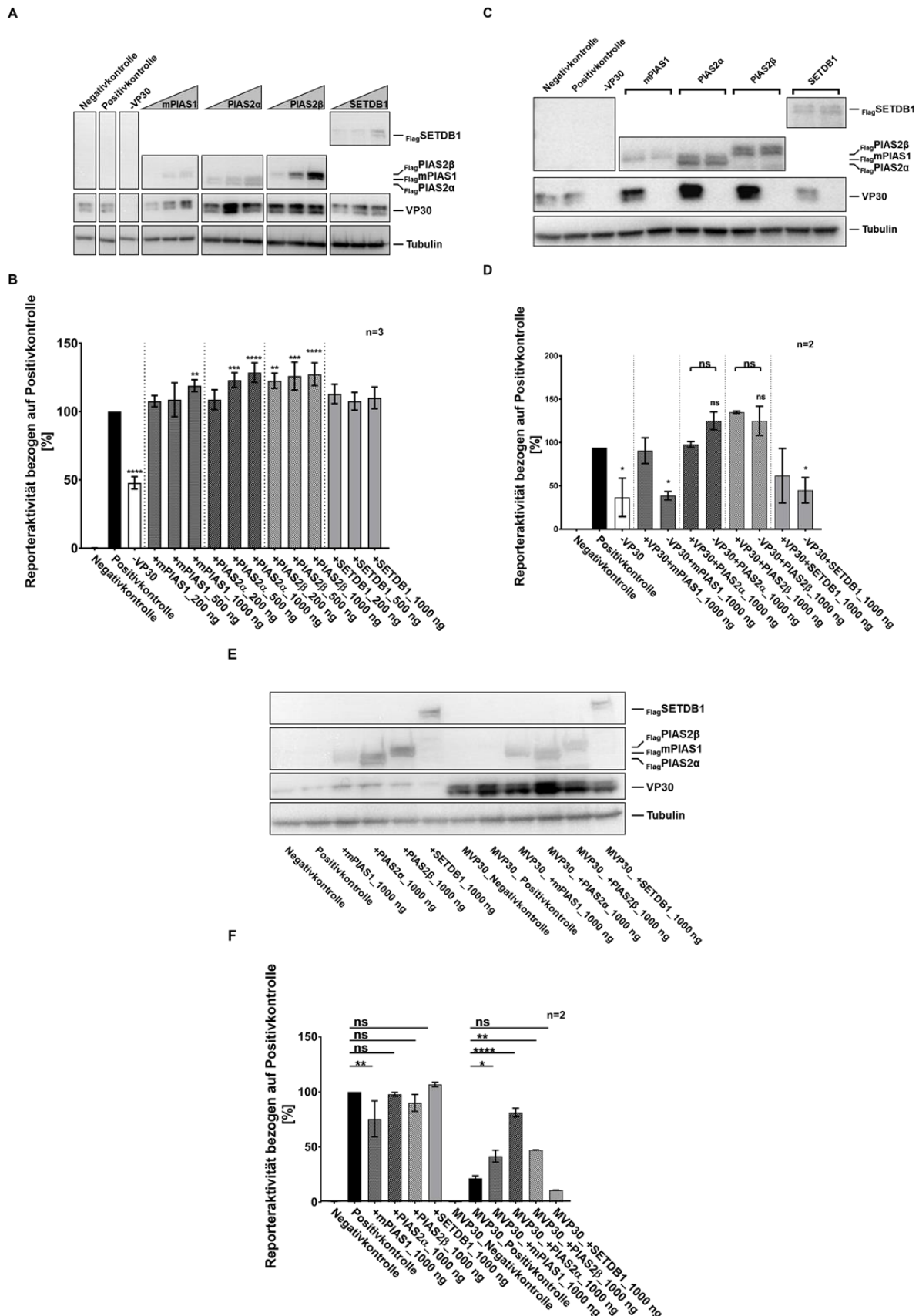


Abbildung 19: Einfluss von PIAS Proteinen und SETDB1 auf die filovirale Transkription.

(A, B) MARV Minigenom-Assays in Anwesenheit von VP30. MARV Minigenom-Assays in Gegenwart von mPIAS1, PIAS2 α , PIAS2 β und SETDB1. HEK293 Zellen, transfiziert mit Expressionsplasmiden für MARV NP, VP30, VP35, L, T7 Polymerase, sowie einem MARV spezifischen Minigenom, kodierend für eine Renilla Luziferase, wurden zusätzlich mit Expressionsplasmiden für $\text{Flag}^{\text{mPIAS1}}$, $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$, $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ oder $\text{Flag}^{\text{SETDB1}}$ in unterschiedlichen Mengen (200 ng, 500 ng, 1000 ng) transfiziert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde durch Verwendung von Leervektor angeglichen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, Western Blot Analysen (A) durchgeführt und die Luziferase-Aktivität (B) gemessen. Positivkontrolle: alle notwendigen Plasmide für die Transkription und Replikation wurden transfiziert, Negativkontrolle: ohne die Polymerase L, -VP30-Kontrolle: ohne VP30. Es erfolgte keine Normalisierung. Eine gleichmäßige Translation wurde anhand der Tubulin-Expression im Western Blot überprüft. Die Positivkontrolle wurde auf 100% gesetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD), Zur statistischen Analyse wurde ein One-Way ANOVA mittels Dunnet's multiple Comparison Test durchgeführt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ (B) Western Blot der Proben in A. Färbung der zu testenden Proteine erfolgte wie in Abbildung 14.

(C, D) MARV Minigenom-Assay in An- oder Abwesenheit von VP30. Experimentelles Vorgehen und Auswertung wie in A, B beschrieben. (C) Western Blot. Färbung der zu testenden Proteine erfolgte wie in Abbildung 14. (D) Luziferase-Assay. Abweichend von A, B wurde ein Student's T test durchgeführt für Einzelvergleiche (Sterne über Vergleichsbalken); * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$

(E, F) EBOV Minigenom-Assays mit EBOV oder MARV VP30. EBOV Minigenom-Assays in Gegenwart von mPIAS1; PIAS2 α , PIAS2 β und SETDB1. HEK293 Zellen, transfiziert mit Expressionsplasmiden für EBOV NP, VP30, VP35, L, T7 Polymerase, sowie einem EBOV spezifischen Minigenom, kodierend für eine Renilla Luziferase, wurden zusätzlich mit Expressionsplasmiden für $\text{Flag}^{\text{mPIAS1}}$, $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\alpha}$, $\text{Flag}^{\text{PIAS2}\beta}$ oder $\text{Flag}^{\text{SETDB1}}$ in unterschiedlichen Mengen (200 ng, 500 ng, 1000 ng) transfiziert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde durch Verwendung von Leervektor angeglichen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, Western Blot Analysen (E) durchgeführt und die Luziferase-Aktivität (F) gemessen. Positivkontrolle: alle notwendigen Plasmide für die Transkription und Replikation wurden transfiziert, Negativkontrolle: ohne die Polymerase L, +MVP30: EBOV VP30 wurde durch MARV VP30 ersetzt. Es erfolgte keine Normalisierung. Eine gleichmäßige Translation wurde anhand der Tubulin-Expression im Westernblot überprüft. Die Positivkontrolle wurde auf 100% gesetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD), Zur statistischen Analyse wurde ein One-Way ANOVA mittels Dunnet's multiple Comparison Test durchgeführt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ (E) Western Blot der Proben in E. Färbung der zu testenden Proteine erfolgte wie in Abbildung 14.

4.8. Analyse der Wirkung von PIAS2 im MARV spezifischen Minigenom-Assay unter Verwendung von PIAS2-KO Zellen

Die für PIAS2 gefundenen Effekte sollten in Abwesenheit von PIAS2 weiter untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden ein Knockdown von PIAS2 mit Hilfe von siRNA und shRNA in HEK293 Zellen etabliert und MARV Minigenom-Assays in den behandelten Zellen durchgeführt (3.4.2). Es zeigten sich unspezifische Effekte der eingesetzten shRNAs und siRNAs auf die Reporteraktivität des MARV Minigenom-Assays, die eine Auswertung spezifischer Effekte unmöglich machten.

Aus diesem Grund erfolgte die weitere Charakterisierung mit Hilfe von PIAS2-KO Zellen, bei denen das Gen für PIAS2 und damit für PIAS2 α und PIAS2 β entfernt wurde. Es wurden PIAS2-KO Zellen verwendet, die mittels CRISPR-CAS-Technologie von der Firma Horizon hergestellt wurden. Die Firma nutzt dabei die bereits in verschiedenen Publikationen beschriebene und auch für Analysen zu EBOV verwendete Zelllinie HAP1 (Carette *et al.*, 2009, 2011). Es handelt sich um eine haploide Zelllinie, die aus der nahezu haploiden Zelllinie KBM-7 hergestellt wurde, welche aus einem Patienten mit Chronisch-myeloischer Leukämie stammt (Andersson *et al.*, 1987; Kotecki, Reddy and Cochran, 1999; Carette *et al.*, 2009).

Eine PIAS2-KO Zelllinie, sowie die Parentalzelllinie HAP1, wurden zunächst mittels Sequenzierung auf die Abwesenheit des PIAS2 Gens hin überprüft und für MARV-spezifische Minigenom-Assays verwendet (3.4.2) (Abbildung 20), wie für HEK293 Zellen im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. In den PIAS2-KO Zellen zeigte sich in An- und Abwesenheit von VP30 eine signifikante Reduktion der MARV-spezifischen Reporteraktivität gegenüber den Parentalzellen (Abbildung 20). In den Ansätzen ohne VP30 zeigte sich sowohl in HAP1, wie auch in PIAS2-KO Zellen eine reduzierte Reporteraktivität gegenüber dem jeweiligen Wildtyp-Ansatz. Der Wildtyp-Ansatz in den PIAS2-KO Zellen zeigte vergleichbare Werte zur -VP30 Probe in HAP1 Parentalzellen. Zudem zeigte sich in den PIAS2-KO Zellen relativ gesehen eine stärkere Abnahme der Aktivität in Abwesenheit von VP30 als in den HAP1-Parentalzellen.

Insgesamt betrachtet decken sich die hier gemachten Beobachtungen mit den bisherigen Ergebnissen der Minigenom-Assays (Abbildung 19), bei denen in Anwesenheit von PIAS2 β die Reporteraktivität leicht erhöht war, während sie in den PIAS2-KO Zellen, in Abwesenheit von PIAS2 β verringert ist.

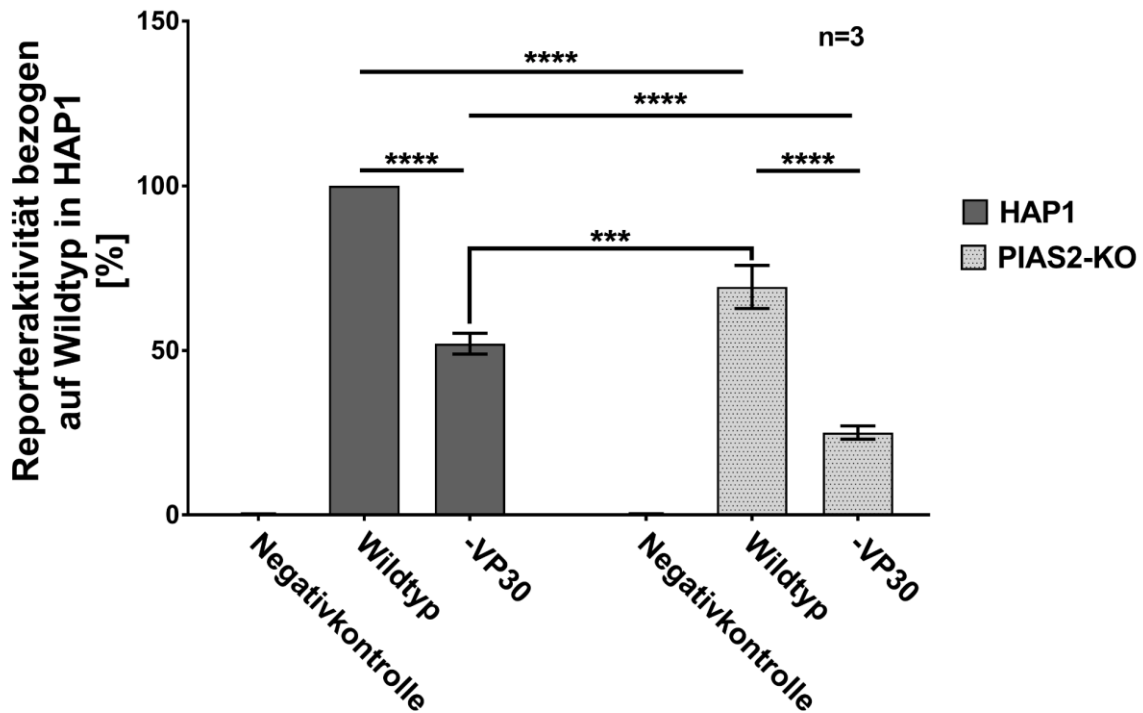


Abbildung 20: MARV Minigenom-Assay in PIAS2-Knockout Zellen, in An- und Abwesenheit von VP30.

PIAS2-KO Zellen und HAP1 Parentalzellen wurden wie in Abbildung 19 beschrieben transfiziert, 48 h später lysiert und die Luziferase-Aktivität in den Proben bestimmt (A) Wildtyp: alle notwendigen Plasmide für die Transkription und Replikation wurden transfiziert, Negativkontrolle: ohne die Polymerase L, -VP30-Kontrolle: ohne VP30. Der Wildtyp-Ansatz von HAP1 Parentalzellen wurde auf 100% gesetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD), Zur statistischen Analyse wurde ein Two-Way ANOVA mittels Sidak's multiple Comparison Test zwischen HAP1 und PIAS2-KO Zellen durchgeführt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Außerdem wurde ein Two-Way ANOVA mittels Dunnet's multiple Comparison Test zwischen den Proben durchgeführt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

4.9. Analyse des Einflusses von PIAS2 bei Infektion von PIAS2-KO und HAP1 Parentalzellen mit MARV Musoke

Die bisher beobachteten Wirkungen von PIAS2 sollten in einer Infektion von PIAS2-KO Zellen mit MARV Musoke weiter analysiert werden (Abbildung 21). Dabei sollte getestet werden, ob und ggf. welchen Einfluss die Gegenwart von PIAS2 für die Virusreplikation und die Expression viraler Proteine hat. Zunächst wurden HAP1 Parentalzellen und PIAS2-KO Zellen mit 2 unterschiedlichen Virusverdünnungen (Multiplicity of Infection= MOI) infiziert (MOI: 0,01 und 0,001) (3.4.4.). Die Zellen wurden an Tag 1, Tag 3 und Tag 6 nach der Infektion geerntet (Abbildung 21A, D). Aus den Überständen der Zellkultur wurde RNA für den Nachweis viraler Genome aufgereinigt (3.1.4.4). Die RNA wurde mittels einer Filovirus-spezifischen qRT-PCR, deren Primer im Bereich des Gens für die virale Polymerase L binden, analysiert (Abbildung 21D). Eine Standardkurve diente der Bestimmung der Zahl der viralen Genome/ml. Die infizierten Zellen wurden geerntet, in Probenpuffer lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der viralen Proteine NP und VP30 untersucht (Abbildung 21A, B, C). Die Proteinexpression zeigte dabei geringfügige Unterschiede. Hier schien die Expression von MARV NP und MARV VP30 in den PIAS2-KO Zellen leicht erhöht zu sein (Abbildung 21A, B, C).

Bei der Analyse der Zahl der viralen Genome im Überstand (Abbildung 21D) zeigte sich bei den PIAS2-KO Zellen eine geringfügige Reduktion gegenüber den Parentalzellen bei einer MOI von 0,001, die sich im zeitlichen Verlauf an Tag 6 ausglich. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch bei einer MOI von 0,01. Hier erfolgte ein Ausgleich bereits an Tag 3. Diese Effekte, wenn auch schwach ausgeprägt, korrelieren mit den Beobachtungen aus den verschiedenen Minigenom-Analysen in HEK293 Zellen (4.7, Abbildung 19) und HAP1 Zellen (0, Abbildung 20). Auch in den HAP1 Zellen war in Abwesenheit von PIAS2 eine reduzierte Aktivität zu beobachten (Abbildung 20). Bei Überexpression von PIAS2 in HEK293 Zellen konnte zum Teil eine Erhöhung der Aktivität beobachtet werden (Abbildung 19).

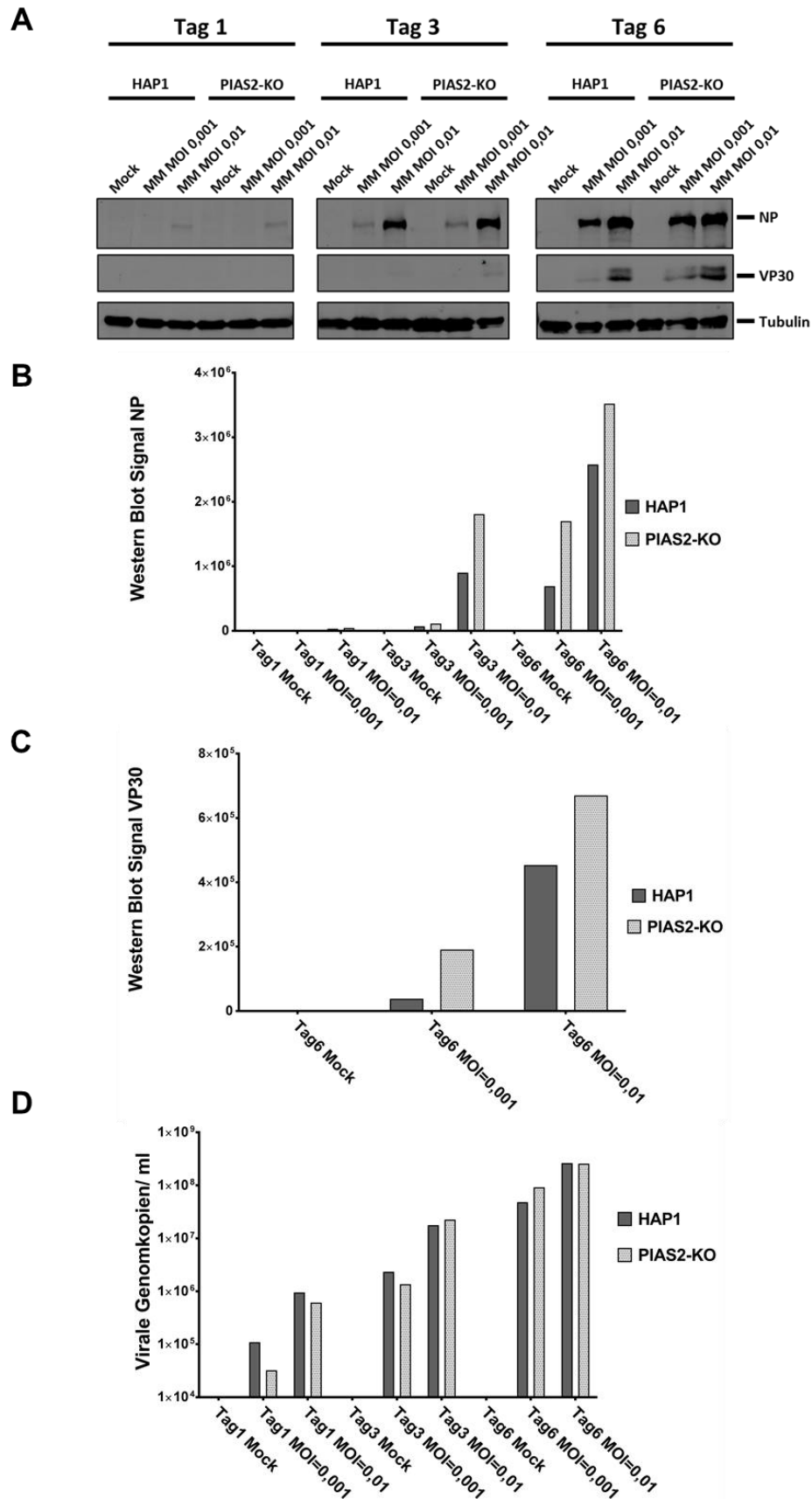


Abbildung 21: MARV Infektion von HAP1 Parental und PIAS2-KO Zellen.

BSL4 Arbeiten wurden durchgeführt von Dr. Verena Krähling. HAP1 Parental und PIAS2-KO Zellen wurden unter BSL4 Bedingungen mit MARV Musoke und einer MOI von 0,001 oder 0,01 infiziert. An

den Tagen 1, 3, und 6 nach der Infektion wurden die Überstände für die Isolierung von RNA verwendet. Diese wurde in einer MARV-spezifischen qRT-PCR zur Bestimmung der Anzahl viraler Genome eingesetzt (3.1.3.). Die infizierten Zellen wurden geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (A) Western Blot von Lysaten infizierter Zellen. MARV NP wurde mittels Maus anti-NP, MARV VP30 mittels Maus anti-VP30 und Tubulin mittels Maus anti-Tubulin Primärantikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein Alexa 680 Ziege anti-Maus Antikörper eingesetzt und die Detektion erfolgte fluoreszenzbasiert am Li-Cor Odyssey Imaging System. (B, C) Quantifizierung der viralen Proteine in den Zelllysaten. Die Signale für MARV NP (B) und MARV VP30 (C) wurden unter Verwendung der Li-Cor Odyssey Software quantifiziert. (D) MARV spezifische qRT-PCR. Die Anzahl der viralen Kopien/ml wurde mittels L-spezifischer qRT-PCR und einem etablierten qRT-PCR-Standard bestimmt (3.1.3)

5. Diskussion

5.1. Die Bedeutung von VP30 im viralen Replikationszyklus

VP30 ist zusammen mit der viralen RNA und den Proteinen NP, VP35, L, VP24 Bestandteil der Nukleokapside (Becker *et al.*, 1998; Bharat *et al.*, 2011, 2012; Wan *et al.*, 2017). Die Transkription und Replikation der durch NP enkapsidierten RNA erfolgt durch einen Polymerasekomplex, bestehend aus der Polymerase L und dem Polymerasekofaktor VP35. Dabei spielen auch die Proteine VP30 und NP eine wichtige Rolle.

VP30 stellt einen viralen Transkriptionsfaktor dar (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999). Die genaue Funktionsweise des MARV VP30 ist bislang unbekannt. Die virale Transkription von MARV läuft in Abwesenheit von VP30 ab (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999; Wenigenrath *et al.*, 2010), wird von VP30 jedoch um das 2-3fache gesteigert (Wenigenrath *et al.*, 2010). Zudem wurde gezeigt, dass ein Ausschalten von MARV VP30 durch RNA Interferenz zu einer deutlichen Reduktion der viralen Proteinexpression und Freisetzung führt (Fowler *et al.*, 2005) und auch eine Herstellung von rekombinanten Viren nur in Gegenwart von VP30 erfolgreich ist (Enterlein *et al.*, 2006).

EBOV VP30 stellt hingegen einen für EBOV essentiellen Transkriptionsfaktor dar (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999; Modrof *et al.*, 2002; Biedenkopf *et al.*, 2013, 2016; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016). Es vermittelt die Transkriptionsinitiation durch Überwindung von RNA-Sekundärstrukturen (Modrof *et al.*, 2002; Weik *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2008). Außerdem konnte vor kurzem gezeigt werden, dass EBOV VP30 abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus wesentlich am Umschalten von viraler Transkription zu viraler Replikation bei EBOV beteiligt ist (Biedenkopf, Lier and Becker, 2016). In Gegenwart von nicht-phosphoryliertem EBOV VP30 kommt es zur Transkription während in Gegenwart von phosphoryliertem EBOV VP30 die Replikation bevorzugt abläuft. Dabei ist EBOV VP30 jedoch nicht essentiell für die virale Replikation (Mühlberger *et al.*, 1999; Modrof *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2008). Für MARV VP30 wurden diese Ergebnisse bisher nicht bestätigt. Da die Phosphorylierungsstellen und andere Motive zwischen MARV und EBOV VP30 konserviert sind, liegt ein ähnlicher Mechanismus nahe.

Um neue Erkenntnisse über den Einfluss von VP30 im viralen Replikationszyklus zu sammeln sollten neue zelluläre Proteine identifiziert werden, mit denen MARV VP30 interagiert, und die im filoviralen Replikationszyklus eine wichtige Rolle spielen könnten. Zu diesem Zweck wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Assay für MARV VP30 durchgeführt.

5.2. Auswahl von VP30 Interaktionspartnern aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay für weitere Analysen

Im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay wurden fünf verschiedene Proteine als Interaktionspartner von MARV VP30 identifiziert (4.1): SETDB1, HECTD1, RBBP6, PIAS2 und PIAS1 (Abbildung 12). Die gefundenen Interaktionspartner wurden weiter in Bezug auf ihre Funktion analysiert. Dabei wurde eine Gewichtung nach verschiedenen Kriterien hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung im filoviralen Replikationszyklus vorgenommen. Wichtige Rollen hierbei spielten die physiologischen Funktionen der Proteine in der Zelle (5.2.1), die Häufigkeit ihres Auftretens im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay (Abbildung 12), sowie Interaktionen untereinander und mit anderen wichtigen Proteinen (Abbildung 22).

5.2.1. Funktionen der gefundenen Interaktionspartner

Bei den Proteinen PIAS1 und PIAS2 (1.2) handelt es sich um E3-Sumo-Ligasen mit einem Molekulargewicht von 63-72 kDa (Liu *et al.*, 1998; Johnson and Gupta, 2001; Shuai and Liu, 2005), die eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalwegen spielen, darunter der JAK-STAT-Signalweg (Chung *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Miyauchi *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2003) und der p53-Signalweg (Kahyo, Nishida and Yasuda, 2001; Megidish, Xu and Xu, 2002; Schmidt and Muller, 2002). Es wurde gezeigt, dass PIAS1 die Bindung von aktivierten und phosphorylierten STAT-Dimeren an die DNA verhindert und dadurch die Interferon-Antwort inhibiert (Liu *et al.*, 1998, 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass PIAS1 mit EBOV VP35 interagiert und zudem an der EBOV VP35 vermittelten Hemmung der Interferon-Antwort beteiligt ist (Chang *et al.*, 2009) (Abbildung 22) (1.1.5.2). PIAS2 vermittelt im Gegensatz zu PIAS1 die Hemmung von STAT4 (Arora *et al.*, 2003). Für Influenza A Virus wurde gezeigt, dass PIAS1 und PIAS2 das virale Nukleoprotein sumoylieren, dass PIAS2 α mit dem Nukleoprotein interagiert und dass die ektopische Expression von PIAS2 α zu erhöhten Virustitern führt (Han *et al.*, 2014).

Bei dem Protein SETDB1 (1.3) handelt es sich um eine Histon-H3-K9-Methyltransferase mit einem Molekulargewicht von 143 kDa, die in der Zelle spezifisch den Lysinrest (K) 9 des Histons H3 methyliert (Yang *et al.*, 2002). Dies führt zu einer epigenetischen Repression der Transkription innerhalb dieser Bereiche. Somit sorgt SETDB1 für ein *Silencing* d. h. ein Abschalten oder Herunterregeln euchromatischer Gene (Schultz *et al.*, 2002).

Bei RBBP6 handelt es sich um eine E3-Ubiquitin-Ligase, mit einem Molekulargewicht von 202 kDa (Sakai *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1997; Pugh *et al.*, 2006). Sie ist am Ubiquitin-vermittelten Abbau von „Nuclease-sensitive element-binding protein 1“ (*Y-box-binding protein 1*, YBX1) beteiligt (Chibi *et al.*, 2008). YBX1 kann unter anderem wichtig für die Stabilität viraler RNAs sein (Chatel-Chaix *et al.*, 2013; Mu *et al.*, 2013).

Bei HECTD1 handelt es sich ebenfalls um eine E3-Ubiquitin-Ligase mit einem Molekulargewicht von 289 kDa, die zuerst für ihre Rolle bei der Entwicklung des Kopf-

Mesenchyms entdeckt wurde (Zohn, Anderson and Niswander, 2007). Sie ist in der Lage andere Proteine zu ubiquitinylieren und ist an der Regulation der Dynamik von fokalen Adhäsionen beteiligt (Li *et al.*, 2013; Deng and Huang, 2014).

Aufgrund der bis zu diesem Zeitpunkt gesammelten Daten wurden zudem Daten aus einem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay mit EBOV VP30 einer Revision unterzogen (unveröffentlichte Daten Hosam Shams-Eldin, Nadine Biedenkopf, AG Becker, Institut für Virologie Marburg). Dabei zeigte sich, dass auch hier SETDB1, RBBP6 und PIAS2 auftauchten, dort jedoch aufgrund einer Interaktion mit p53 als Kontrolle ausgeschlossen wurden. SETDB1 (Noh, Kim and Kim, 2014; Fei *et al.*, 2015), RBBP6 (Simons *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2007) und PIAS2 (Schmidt and Muller, 2002) interagieren jedoch physiologisch mit p53, sodass sie als echte Interaktionspartner von VP30 angesehen werden können (Abbildung 22).

Aufgrund der Häufigkeit ihres Erscheinens im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay wurde eine Rangfolge der Interaktionspartner erstellt. SETDB1 zeigte die meisten Hits (26) gefolgt von HECTD1 (25), RBBP6 (8), PIAS2 (3) und PIAS1 (2). Dabei wurden SETDB1 und RBBP6 in beiden Durchläufen des Hefe-Zwei-Hybrid-Assays identifiziert.

5.2.2. Interaktionsnetzwerk

Auf Grundlage, der im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Daten und der Interaktionen der viralen Proteine untereinander wurde ein Interaktionsnetzwerk der identifizierten Proteine erstellt (Abbildung 22). Integriert wurden weiterhin Daten aus zwei Publikationen, in denen mittels Massenspektrometrie eine Interaktion von SETDB1 und HECTD1 (Huttlín *et al.*, 2015), sowie mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Assay eine Interaktion von RBBP6 mit PIAS1 (Wang *et al.*, 2008) gezeigt werden konnte.

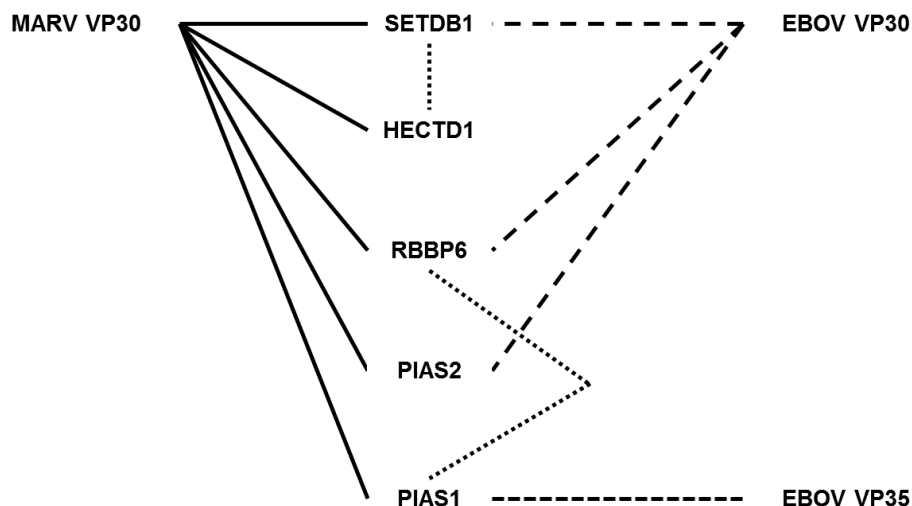


Abbildung 22: Interaktionsnetzwerk.

Dargestellt sind die im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay für MARV VP30 identifizierten Proteininteraktionen (Verbindungslinien). Daten zu Interaktionen des EBOV VP30 (Unterbrochene Linien (Unveröffentlichte Daten, Hosam Shams-Eldin, Nadine Biedenkopf, AG Becker, Institut für Virologie Marburg). Publierte Daten zur Interaktion von PIAS1 und EBOV VP35 (Chang *et al.*, 2009) (enge unterbrochene Linie) und

zu den Interaktionen der gefundenen Proteine untereinander (Wang *et al.*, 2008; Huttlin *et al.*, 2015) (Gepunktete Linien)

Die Funktionen der PIAS-Proteine im JAK-STAT-Signalweg und die gezeigte Interaktion von PIAS1 mit EBOV VP35 machten PIAS1 und PIAS2 für weitere Analysen interessant. Das häufige Auftreten von SETDB1 im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay, seine Funktion als epigenetischer Repressor, sowie dessen Identifizierung als zellulärer Faktor für den EBOV Viruseintritt machten SETDB1 ebenfalls für weitere Analysen interessant. Daher wurden PIAS1, PIAS2 und SETDB1 für weitere Analysen ausgewählt und charakterisiert.

5.3. Rolle von PIAS1 und PIAS2 im filoviralen Replikationszyklus

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Interaktion von MARV VP30 mit PIAS1 und PIAS2 gezeigt (4.1). Maus-PIAS1 (mPIAS1), sowie PIAS2 α und PIAS2 β , die beiden häufigsten Isoformen von PIAS2 wurde im Verlauf der Arbeit charakterisiert und zeigten im Western Blot Proteine der erwarteten Größe (4.2), sowie eine nukleäre Lokalisation, wie diese bereits beschrieben sind (Miyauchi *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

5.3.1. Interaktion von PIAS1 mit anderen Viren

Für PIAS1 wurde bereits eine Interaktion mit EBOV gezeigt (Chang *et al.*, 2009), sowie mit einer Reihe weiterer Viren, darunter Seoul und Hantaan Virus (B.-H. Lee *et al.*, 2003), Humanes Cytomegalievirus (HCMV) (J.-M. Lee *et al.*, 2003), EBV (Epstein-Barr-Virus) (Chang *et al.*, 2004), Humanes und Bovines Papillomavirus (HPV) und (BPV) (Rosas-Acosta *et al.*, 2005).

5.3.2. Interaktion von PIAS2 mit anderen Viren

Für PIAS2 konnte in der Vergangenheit eine Interaktion mit anderen Viren gezeigt werden, so z. B. mit den Seoul und Hantaan Hantaviren, die ebenfalls ein Einzelstrang RNA Genom negativer Polarität besitzen (B.-H. Lee *et al.*, 2003) oder mit Influenza A Viren (Han *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde auch eine Interaktion von PIAS2 mit HPV und BPV (Rosas-Acosta *et al.*, 2005), EBV (Liu *et al.*, 2006) und eine Rekrutierung in Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV1) induzierte Foci (Cuchet-Lourenço *et al.*, 2011) beobachtet.

5.3.3. Bestätigung der Interaktion von PIAS1 und PIAS2 mit VP30

Die Interaktion von PIAS1 mit MARV VP30 wurde mittels Ko-Immunpräzipitation bestätigt (4.3). Die Interaktion von PIAS2 mit VP30 wurden mittels Ko-Immunpräzipitation für PIAS2 α und PIAS2 β ebenfalls bestätigt (4.3). Dabei wurde gezeigt, dass PIAS1 und PIAS2 α und PIAS2 β ebenfalls mit EBOV VP30 interagieren. Dies legt nahe, dass zwischen MARV und EBOV VP30 konservierte Bereiche die Interaktion mit PIAS1 und PIAS2 vermitteln (Abbildung 23). Da außerdem eine Interaktion von VP30 mit PIAS1, PIAS2 α und PIAS2 β erfolgt, ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion über konservierte Bereich von mPIAS1, PIAS2 α und PIAS2 β erfolgt und schließt den äußeren C-Terminus aus, der nicht in PIAS2 α enthalten ist

(1.2.1)(Liu *et al.*, 1998). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass EBOV VP35 mit PIAS1 interagiert (Chang *et al.*, 2009), wobei eine Funktion von PIAS1 in der VP35 vermittelten Reduktion der Interferon-Antwort beschrieben ist. Dabei wurde gezeigt, dass EBOV VP35 mittels PIAS1 eine Sumoylierung von IRF7 herbeiführt und so die Interferon-Induktion reduziert (Chang *et al.*, 2009). Daher stellt sich die Frage, ob die Interaktion von MARV und EBOV VP30 mit PIAS1 eine ähnliche oder andersartige Aufgabe erfüllt, da für EBOV und MARV VP30 bisher keine Reduktion der Interferon-Induktion gezeigt wurde.

5.3.4. Charakterisierung der Bindungsstelle auf MARV VP30

Der Bereich des MARV VP30 Proteins, der für die Interaktion mit PIAS2 β zuständig ist, wurde mit Hilfe von Deletionsmutanten eingegrenzt auf die Aminosäuren 35-116 des N-Terminus von MARV VP30 (Abbildung 23) (4.4). Durch Verwendung einer monomeren VP30-Mutante (Hartlieb *et al.*, 2003) konnte gezeigt werden, dass die in EBOV und MARV VP30 konservierte Homooligomerisierungsdomäne nicht essentiell für die Interaktion von PIAS2 und VP30 zu sein scheint. Somit kommen weiterhin die Phosphorylierungsstellen, das Cys3-His Zinkfinger-Motiv und eine Prolin-Prolin Domäne als weitere wichtige Motive für eine Interaktion in Frage (4.4) (Abbildung 23).

Die Phosphorylierungsstelle und das Zink-Finger-Motiv spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung von EBOV VP30 an virale und zelluläre RNA und diese Bereiche sind bei EBOV und MARV konserviert (Modrof, Becker and Mühlberger, 2003; John *et al.*, 2007; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016; Schlereth *et al.*, 2016). Da die Phosphorylierungsstellen bei EBOV zudem eine wichtige Funktion für VP30 beim Umschalten von viraler Transkription zu viraler Replikation spielen, könnte PIAS2 beispielsweise über eine Interaktion an dieser Stelle Einfluss auf die Regulation von viraler Transkription und Replikation ausüben (Biedenkopf *et al.*, 2013; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016; Lier, Becker and Biedenkopf, 2017). Auch das Cys3-His Zinkfinger-Motiv kommt als Interaktionsstelle in Betracht. Es hat ebenfalls Einfluss auf die RNA-Bindung und die Eigenschaft von VP30 als Transkriptionsfaktor (Modrof, Becker and Mühlberger, 2003; John *et al.*, 2007; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016).

Für PIAS1 erfolgte zunächst keine weitere Analyse der genauen Interaktionsstelle. Aufgrund der relativ hohen Homologie (>50%) zwischen den PIAS-Proteinen (1.2.1, Abbildung 8) (Liu *et al.*, 1998), könnte es sich bei PIAS1 um eine ähnliche Interaktionsstelle handeln wie bei PIAS2. Nach einer Identifikation der Interaktionsstelle für PIAS2 sollte diese in Zukunft auch für PIAS1 getestet werden.

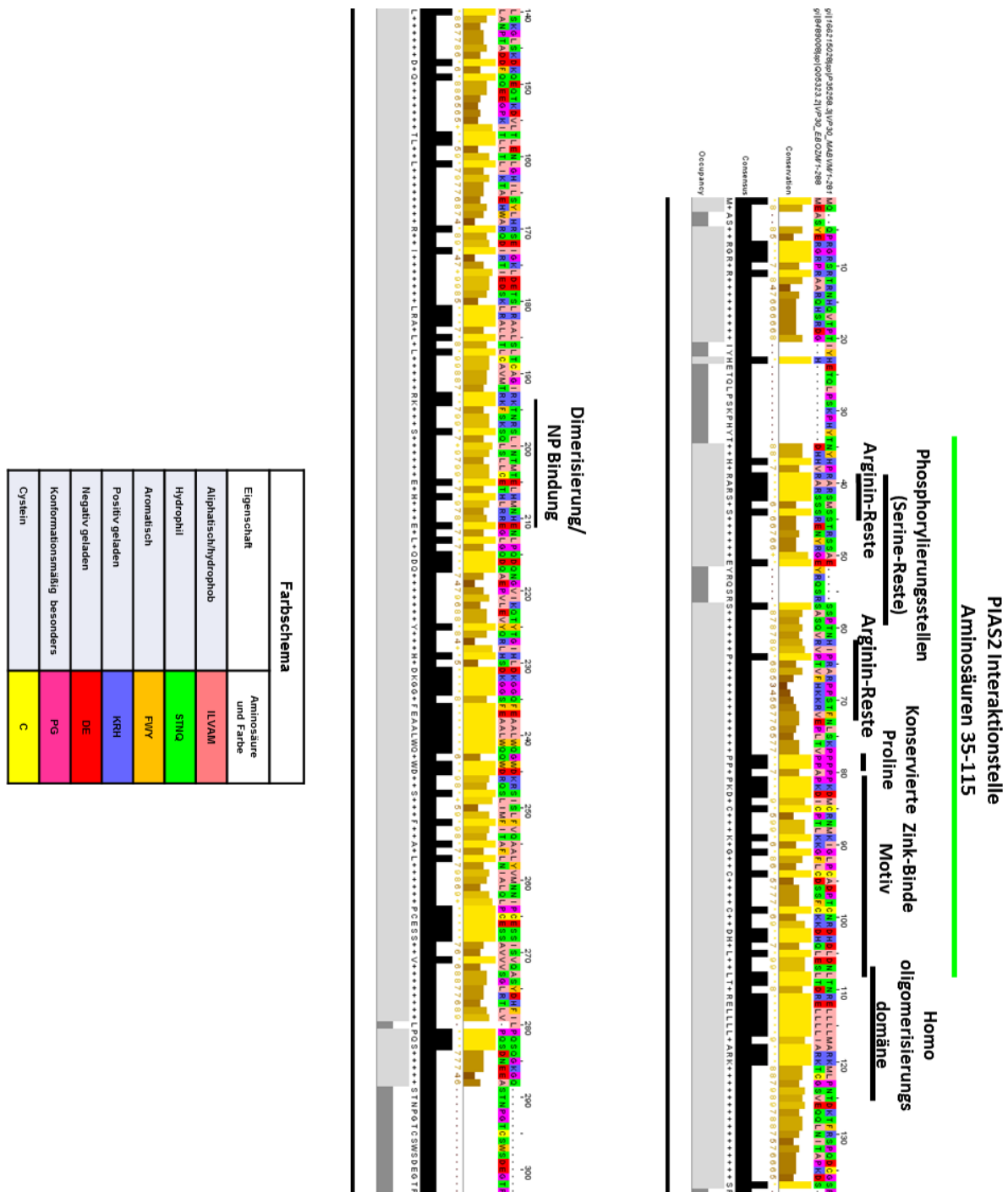


Abbildung 23: Alignment der Aminosäuresequenz von MARV und EBOV VP30, Darstellung relevanter Domänen und Motive und der Bindungsstelle von PIAS2.

Für die Aminosäuresequenzen von MARV VP30 (UniProt-Id: P35258) und EBOV VP30 (UniProt-Id: Q05323) wurde mittels des Bioinformatik Tools Clustal Omega ein Alignment erstellt (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011). Die Farben der Aminosäuren repräsentieren deren Eigenschaften nach dem angegebenen Schema. Bekannte Motive wurden markiert (Modrof *et al.*, 2001, 2002, Hartlieb *et al.*, 2003, 2007; Modrof, Becker and Mühlberger, 2003; Biedenkopf *et al.*, 2013, 2016; Biedenkopf, Lier and Becker, 2016). Der Bereich, der für die Interaktion mit PIAS2 notwendig ist (Aminosäuren 35-115) wurde grün markiert.

5.3.1. Intrazelluläre Lokalisation der PIAS2-VP30-Interaktion

Eine Analyse von MARV VP30 und PIAS2 β in der Immunfluoreszenzanalyse sollte die Lokalisation der Interaktion in der Zelle aufdecken (4.5). Dabei konnte in einigen Zellen eine Kolokalisation von PIAS2 β und VP30 beobachtet werden, wobei die Korrelation in Zellen erhöht war, in denen VP30 im Zellkern lokalisiert war (Abbildung 16, Abbildung 17). In Zusammenhang mit den Daten aus den Ko-IP Analysen (4.3, 4.4) könnte über eine Interaktion von PIAS2 β und VP30 im Zellkern spekuliert werden, wobei für eine gesicherte Aussage weitere Experimente notwendig sind. Darüber hinaus wurde in Anwesenheit von MARV NP keine Kolokalisation von PIAS2 β und VP30 beobachtet. Außerdem zeigte NP mit VP30 deutliche höhere Korrelationswerte als PIAS2 β mit VP30. MARV NP könnte möglicherweise mit PIAS2 β um die Bindung von VP30 konkurrieren und so eine Interaktion zwischen PIAS2 β und VP30 verhindern. Dies würde eine fehlende Kolokalisation von PIAS2 β und VP30 in Gegenwart von NP erklären.

Darüber hinaus wurde eine Lokalisation von MARV VP30 und NP im Zellkern unabhängig von PIAS2 β beobachtet, was bisher nicht in der Literatur beschrieben ist.

Bei einigen Viren konnte eine Interaktion von PIAS2 mit viralen Proteinen im Zellkern beobachtet werden, z. B. für HSV-1 ICP-4 (Cuchet-Lourenço *et al.*, 2011) und EBV Rta (Liu *et al.*, 2006). Da es sich bei den betreffenden Viren jedoch um DNA-Viren handelt, kommen die jeweiligen viralen Proteine physiologisch in deutlichen Mengen im Zellkern vor. Bei den Seoul und Hantaan Viren, bei denen es sich um RNA-Viren handelt, wurde eine Interaktion von NP mit PIAS2 β im Zytoplasma beobachtet, die jedoch etwas diffus ausfiel, während im Zellkern keine Kolokalisation beobachtet wurde (B.-H. Lee *et al.*, 2003).

Für RNA-Viren ist eine Interaktion im Zellkern nicht naheliegend, da die Virusreplikation im Zytoplasma erfolgt. Die seltene, möglicherweise temporäre, Lokalisation von MARV VP30 in den Zellkern zeigt jedoch, dass dieses in der Lage ist in den Zellkern zu gelangen und ggf. dort mit PIAS2 β zu interagieren.

In diesem Zusammenhang ist auch die Veröffentlichung von Chang *et al.* zu nennen bei der eine Interaktion von EBOV VP35 und PIAS1 mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Assay und KoIP-Analysen gezeigt wurde (Chang *et al.*, 2009). Eine Lokalisation der Interaktion wurde nicht gezeigt, sodass sich die Frage stellt, wo die Interaktion von VP35 und PIAS1 stattfindet und ob der Zellkern dabei ebenfalls eine Rolle spielt.

5.3.2. Charakterisierung der Anti-Interferon-Wirkung von PIAS1 und PIAS2 in Bezug auf IFIT2

Die PIAS-Proteine, darunter PIAS1 wurden als Repressor der JAK-STAT-Signalkaskade identifiziert (Liu *et al.*, 1998; Liao, Fu and Shuai, 2000). PIAS1 verhindert bei Behandlung mit Interferon die Bindung von aktivierten STAT1-Dimeren an die DNA (Liu *et al.*, 1998; Liao, Fu and Shuai, 2000), während PIAS2 α durch Sumoylierung zu einer Hemmung von STAT1 führt

(Rogers, Horvath and Matunis, 2003). Für PIAS2 β wurde hingegen eine Hemmung von STAT4 beschrieben, indem es als Korepressor wirkt (Arora *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass Pias1(-/-)-Knockout-Mäuse eine verstärkte antivirale Aktivität und eine erhöhte Überlebensrate bei Infektion mit VSV, einem Vertreter der *Mononegavirales* zeigen (Liu *et al.*, 2004). Bei Infektion von Pias1(-/-)-Knockout-Mäusen mit MHV-68, einem Herpesvirus, waren deutlich reduzierte Virustiter zu beobachten (Liu *et al.*, 2004). Dabei scheint PIAS1 selektiv auf sog. PIAS1-sensitive Gene zu wirken (Liu *et al.*, 2004; Shuai and Liu, 2005). PIAS1 scheint die Aktivierung von Genen zu verhindern, die einen schwachen STAT1-Promotor haben, wie z. B. CXCL10, CXCL9, GBP1, während Gene mit einem starken STAT1-Promotor, wie IRF-7, IRF-1 und IFI204 nicht von einer Hemmung betroffen sind.

Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob mPIAS1 sowie PIAS2 α und PIAS2 β in der Lage sind eine Hemmung des ISGs IFIT2 (IFN-Induced Protein With Tetratricopeptide repeats 2) zu bewirken.

IFIT2 vermittelt bei Stimulation mit Interferon, viraler Infektion oder Erkennung von PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) eine Hemmung der viralen und zellulären Translation (Diamond and Farzan, 2013). Dabei ist es zusammen mit IFIT1 auch an der Erkennung viraler RNAs beteiligt (Pichlmair *et al.*, 2011).

MARV und EBOV VP35 hemmen effektiv die Interferonsynthese und damit die Aktivierung des ISGs IFIT2 (Basler *et al.*, 2000, 2003; Cárdenas *et al.*, 2006; Ramanan *et al.*, 2012), indem die Erkennung von viralen RNAs durch RIG-I oder MDA5 (Cárdenas *et al.*, 2006; Ramanan *et al.*, 2012) und die Phosphorylierung von IRF-3 und IRF-7 verhindert wird (Basler *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2009; Prins, Cardenas and Basler, 2009). Für EBOV VP35 konnte auch gezeigt werden, dass PIAS1 an der VP35-vermittelten Hemmung der Phosphorylierung von IRF-3 beteiligt ist (Chang *et al.*, 2009).

Im Gegensatz dazu hemmen MARV VP40 und EBOV VP24 die Interferon-Signalkaskade und damit die Aktivierung von IFIT2. MARV VP40 verhindert die Aktivierung von Jak1 (Valmas *et al.*, 2010; Valmas and Basler, 2011) und EBOV VP24 den Eintritt von phosphorylierten STAT-Dimeren in den Kern (Reid *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2010).

Zudem ist IFIT2 während einer Infektion mit MARV oder EBOV differentiell reguliert (Edwards *et al.*, 2016). Bei einer Infektion mit MARV kommt es 24 h nach Infektion zu erhöhter Expression der IFIT2-mRNA, während sich bei einer Infektion mit EBOV generell nur sehr geringe IFIT2-mRNA-Level zeigen.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Hemmung der IFIT2-Promotor-Aktivierung durch PIAS1 und PIAS2 gezeigt werden. Dabei zeigten mPIAS1 und PIAS2 β eine deutlich stärkere Hemmung als PIAS2 α . Das bedeutet, dass IFIT2 sowohl PIAS1-sensitiv als auch PIAS2-sensitiv ist und, dass die exprimierten Proteine für mPIAS1, PIAS2 α und PIAS2 β hinsichtlich ihrer anti-Interferonwirkung funktionell sind.

Falls MARV VP30 durch Bindung an PIAS1 oder PIAS2 deren Funktion reguliert, könnte MARV VP30 Einfluss auf die Interferon-Signalkaskade nehmen, was bisher nicht gezeigt ist. Dies könnte einen positiven Einfluss auf die virale Translation und den Replikationszyklus von MARV haben.

Eine solche Hemmung wäre ähnlich zu der bei EBOV VP24 beschriebenen Hemmung der Interferon-Signalkaskade durch Hemmung von aktiviertem STAT und würde sich damit von der bisher für EBOV VP35 beschriebenen Funktion von PIAS1 unterscheiden (Chang *et al.*, 2009), bei der VP35 durch PIAS1-vermittelte Sumoylierung eine Reduktion der Interferon-Produktion bewirkt.

Eine Regulation von IFIT2 über PIAS2 und VP30 könnte somit einen weiteren Weg der Interferon-Hemmung bilden und die bisher bekannten Wege der filoviralen Interferon-Hemmung erweitern. Für MARV VP30 und EBOV VP30 wurde eine solche Hemmung der Interferonantwort bisher nicht gezeigt. Daher wird in Zukunft die Frage zu klären sein, ob und welche Rolle VP30 hier spielt. Hier müssen weitere Analysen klären, ob VP30 über eine Interaktion mit PIAS2 in der Lage ist die Interferon-Signalkaskade zu hemmen. Außerdem ist zu klären, ob MARV VP30 und PIAS2 analog zu EBOV VP35 und PIAS1 in der Lage sind, die Phosphorylierung von IRF-3 zu beeinflussen und ob die Sumoylierung hier eine Rolle spielt.

5.3.3. Einfluss von PIAS1 und PIAS2 auf die Funktion von VP30 als Transkriptionsfaktor

VP30 spielt eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor in der viralen Transkription von MARV und EBOV. Im Fall von EBOV ist VP30 essentiell für eine effektive virale Transkription, während im Falle von MARV die Transkription auch in Abwesenheit von VP30 abläuft (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999). MARV VP30 steigert die virale Transkription jedoch um das 2-3 fache (Wenigenrath *et al.*, 2010), hat starken Einfluss auf die Expression viraler Proteine (Fowler *et al.*, 2005) und ist essentiell für die Herstellung von rekombinanten Viren (Enterlein *et al.*, 2006).

Im nächsten Schritt sollte daher der Einfluss von PIAS1 und PIAS2 auf die virale Transkription und Replikation und die Funktion von VP30 als viraler Transkriptionsfaktor untersucht werden. Die virale Transkription und Replikation wurde mit Hilfe von MARV- und EBOV-spezifischen Minigenom-Assays untersucht (3.4.2, 3.4.3) (Mühlberger *et al.*, 1998, 1999; Wenigenrath *et al.*, 2010).

Bei Überexpression von mPIAS1, PIAS2 α und PIAS2 β im Kontext des MARV-spezifischen Minigenom-Assays war eine leichte konzentrationsabhängige Steigerung der MARV-spezifischen Reporteraktivität zu beobachten.

Diese fiel bei mPIAS1 etwas schwächer aus, als bei PIAS α und PIAS2 β und war bei mPIAS1 in Abwesenheit von VP30 nicht zu beobachten. Daher könnte es sich bei mPIAS1 um einen VP30-abhängigen Effekt auf die MARV-spezifische Transkription handeln. Bei Analyse von

mPIAS1 im EBOV-spezifischen Minigenom-Assay zeigte sich eine Reduktion der EBOV-spezifischen Transkription. Bei Austausch von EBOV VP30 gegen MARV VP30 zeigte sich jedoch wiederum eine Steigerung der Aktivität. Auch dies spricht für einen VP30-abhängigen und ggf. auch VP30-spezifischen Effekt, der bei MARV und EBOV VP30 unterschiedlich ausfallen könnte.

In Gegenwart von PIAS2 β war der Effekt der Steigerung auch schon bei geringer Proteinexpression signifikant. Ein solcher Effekt konnte für PIAS2 auch in Abwesenheit von VP30 beobachtet werden, was die Vermutung nahelegt, dass PIAS2 in der Lage sein könnte die virale Transkriptionsaktivität unabhängig von VP30 zu steigern. Im EBOV-spezifischen Minigenom-Assay zeigte sich in Gegenwart von PIAS2 keine Veränderung der Reporteraktivität. Beim Austausch von EBOV VP30 gegen MARV VP30 im EBOV-spezifischen Minigenom-Assay war jedoch eine Steigerung, ähnlich zu der zuvor im MARV Minigenom-Assay beobachteten Steigerung, zu beobachten. Diese Effekte sprechen hingegen für einen MARV VP30-abhängigen Effekt. Ursache dafür können strukturelle Unterschiede zwischen EBOV und MARV VP30 sein.

Bei Analyse von MARV Minigenom-Assays in PIAS2-KO Zellen zeigte sich im Vergleich zu den parentalen HAP1 Zellen eine deutlich verringerte Reporteraktivität. In Abwesenheit von VP30 war diese noch stärker reduziert. Interessant ist hierbei, dass sich in PIAS2-KO Zellen eine Reduktion ähnlich zur Reduktion in Parentalzellen in Abwesenheit von VP30 zeigt. Auch bei Infektion von PIAS2-KO Zellen zeigte sich bei niedriger MOI (MOI=0,001) eine reduzierte Zahl an viralen Genomen im Überstand. Dies passt zu den vorherigen Analysen mittels Minigenom-Assay.

Die Steigerung der Reporteraktivität kann unterschiedliche Ursachen haben. Für PIAS1 und PIAS2 wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sie in der Lage sind eine Hemmung des ISG IFIT2 zu bewirken. IFIT2 ist in der Lage die Translation zu inhibieren und zusammen mit IFIT1 an der Erkennung viraler RNAs beteiligt (Pichlmair *et al.*, 2011; Diamond and Farzan, 2013). Daher könnte die Hemmung von IFIT2 durch PIAS1 und PIAS2 einen positiven Effekt auf die Translation viraler Proteine und in der Folge auch auf die virale Transkription und Replikation haben, da geringe Mengen der notwendigen viralen Proteine gebildet werden.

Dies würde auch die verringerte Reporteraktivität im Minigenom-Assay in PIAS2-KO Zellen erklären, da hier keine Hemmung von IFIT2 vorliegt.

Die Unterschiede in der Reporteraktivität sollten dabei in Gegenwart von Interferon umso stärker ausfallen. Daher könnten weitere Versuche mit Minigenom-Assays in Gegenwart von Interferon hier weitere Erkenntnisse liefern. Andererseits legt die für EBOV VP35 beobachtete Sumoylierung von IRF-3 mittels PIAS1 (Chang *et al.*, 2009) nahe, dass PIAS1 auch Einfluss auf die Interferon-Synthese haben könnte.

Voraussetzung für einen solchen Mechanismus wäre, dass VP30 PIAS1 und PIAS2 beeinflusst oder reguliert. Daher wird in Zukunft zu testen sein, ob VP30 die Expression von PIAS1 und PIAS2 beeinflusst, z. B. dessen Expression verstärkt oder dessen Abbau verhindert.

Neben ihrer Funktion als Repressor der STAT-Signalkaskade sind die PIAS-Proteine auch in der Lage zelluläre Transkription positiv, wie negativ durch unterschiedliche Mechanismen zu regulieren, wie z. B. Blockierung von Transkriptionsfaktoren, Rekrutierung von Ko-Repressoren und Sumoylierung (Shuai and Liu, 2005).

PIAS1 und PIAS2 könnten die Wirkung von VP30 als Transkriptionsfaktor verstärken und so die Reporteraktivität steigern. So wurde beschrieben, dass PIAS1 die transaktivierende Wirkung von HCMV IE2 (J.-M. Lee et al., 2003) und EBV Rta (Chang et al., 2004) auf andere Promotoren verstärkt. PIAS2 interagiert mit EBV Rta, verstärkt dessen Sumoylierung und führt zu einer verstärkten Rta-vermittelten Transkription des viralen Gens BNLF1 und des zellulären Gens p21 (Liu et al., 2006), wobei PIAS2 β wie in dieser Arbeit einen stärkeren Effekt zeigte. Für Influenza A wurde gezeigt, dass PIAS2 α mit dem Nukleoprotein NP interagiert und dieses stark sumoyliert (Han et al., 2014). Zudem waren in Gegenwart von überexprimierten PIAS2 α die Virustiter deutlich gesteigert.

Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die Wirkung von PIAS1 und PIAS2 auf VP30 denkbar. Hier wäre es interessant zu überprüfen, ob VP30 durch PIAS1 und PIAS2 ebenfalls sumoyliert wird, da dies bei HCMV und EBV im Zusammenhang mit der verstärkten Transaktivierung beobachtet wurde. Auch eine Sumoylierung von anderen viralen und zellulären Proteinen sollte in dieser Hinsicht untersucht werden.

Auch die Interaktion selbst könnte eine Rolle spielen. So scheint der N-Terminus (AS 35-116) essentiell für die Bindung von PIAS2 an MARV VP30 zu sein. Dieser Bereich umfasst neben der Homooligomerisierungsdomäne, die nicht wichtig für die Interaktion zu sein scheint, noch die Phosphorylierungsstellen und ein Cys3-His Zinkfingermotiv. Beide Motive spielen eine wichtige Rolle für die Bindung von VP30 an virale RNAs. Daher wäre es denkbar, dass PIAS2 durch Bindung an diese Motive einen Einfluss auf die Transkription von MARV ausübt, z. B. die Bindung viraler RNAs verbessert.

Daneben wäre es auch denkbar, dass PIAS1 und PIAS2 nicht direkt an VP30 gebunden ist, sondern über weitere Proteine oder Nukleinsäuren. Bei den PIAS-Proteinen ist zwar eine Bindung von DNA mittels der SAP-Domäne bekannt, nicht jedoch von RNA (Kipp et al., 2000). Für die SAP-Domäne ist bei anderen Proteinen jedoch eine Bindung von RNA beschrieben (Léger et al., 2014). Ein hypothetischer Erklärungsansatz könnte sein, dass PIAS1 und PIAS2 in Abwesenheit von VP30 an die virale RNA binden. Hier können KoIP Analysen in Gegenwart von RNase H zukünftig Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von RNA geben

5.3.1. Einfluss von PIAS2 während der Virusinfektion

In der MARV-Infektion von PIAS2-KO Zellen wurden nur geringfügige Unterschiede festgestellt (4.9). Tendenziell zeigten sich jedoch auch hier in den PIAS2-KO Zellen leicht verringerte Virustiter gegenüber den Parentalzellen, was zu den übrigen Ergebnissen aus den Minigenom-Assays in Gegenwart von überexprimiertem PIAS2 und in PIAS2-KO Zellen passt. Ursache für die nur geringen Unterschiede könnte sein, dass es zu einer Kompensation durch andere PIAS-Proteine wie PIAS1, PIAS3 und PIAS4 kommt, welche das Fehlen von PIAS2 ausgleichen und auf diese Weise stärkere Effekte verhindern, da die relativ hohe Homologie der PIAS-Proteine (1.2.1) (Liu *et al.*, 1998) und die Interaktionsstudien zur PIAS-STAT Interaktion eine Redundanz nahelegen (Shuai and Liu, 2005).

So konnte für Influenza A NP gezeigt werden, dass PIAS2 α zu einer starken Sumoylierung führt, die zu höheren Virus-Titern bei Überexpression führt (Han *et al.*, 2014). Dabei wurde jedoch gezeigt, dass PIAS2 β , PIAS1 und PIAS4 ebenfalls eine Sumoylierung von NP bewirken. Diese fiel zwar schwächer aus, könnte aber an Bedeutung gewinnen, sobald PIAS2 α fehlt.

Ein Knockout aller vier PIAS-Proteine könnte hier eine Kompensation verhindern und genaueren Aufschluss über deren Bedeutung während der MARV Infektion liefern.

5.3.1. Wirkung von PIAS1 und PIAS2 als E3-Sumo-Ligasen

In ersten Versuchen konnte keine Sumoylierung von VP30 durch PIAS2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da PIAS1 und PIAS2 als E3-Sumo-Ligase jedoch in der Lage sind eine Vielzahl von Signalwegen zu beeinflussen, müssen hier umfangreiche Untersuchungen folgen, ob und welche viralen Proteine durch PIAS1 und PIAS2 während einer Infektion ggf. sumoyliert werden. Für EBOV VP40 konnte eine Sumoylierung gezeigt werden (Baz-Martínez *et al.*, 2016), wobei die verantwortlichen Sumo-Ligasen bislang unbekannt sind. Neben viralen Proteinen sollten auch zelluläre Proteine für eine Sumoylierung in Betracht gezogen werden. Für EBOV VP35 ist bereits bekannt, dass es mit PIAS1 interagiert und die PIAS1-vermittelte Sumoylierung von IRF-7 verstärkt (Chang *et al.*, 2009). Für PIAS2 ist gezeigt, dass es in der Lage ist, die Ungefaltete Protein Antwort (Unfolded Protein Response = UPR) durch Sumoylierung von XBP1s zu beeinflussen (Chen and Qi, 2010). Diese spielt auch im MARV und EBOV Replikationszyklus eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass MARV VP30 in der Lage ist die UPR-Antwort zu reduzieren (Unveröffentlichte Daten, Verena Krähling, Cornelius Rohde, AG Becker, Institut für Virologie Marburg). Hier könnte VP30 als weiteren Mechanismus die Sumoylierung von XBP1s mittels PIAS2 beeinflussen und so die Wirkung von XBP1s auf die UPR hemmen. Darüber hinaus wurde für PIAS1 ebenfalls ein Einfluss auf die UPR beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass ATF6, ebenfalls ein Transkriptionsfaktor der UPR, durch PIAS1 sumoyliert und dadurch die UPR gehemmt wird (Hou *et al.*, 2017).

5.4. Rolle von SETDB1 im filoviralen Replikationszyklus

Für SETDB1 konnte wie für PIAS1 und PIAS2 zum ersten Mal eine Interaktion mit MARV VP30 mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Assay gezeigt werden. Bei SETDB1 handelt es sich um eine Histon-Methyltransferase, die eine wichtige Rolle in der Chromatin-Regulation spielt, indem sie meist an Abschalt-Prozessen von euchromatischen DNA-Bereichen durch Methylierung von Histonen beteiligt ist (Schultz *et al.*, 2002). Das in dieser Arbeit erstellte SETDB1 Konstrukt zeigte eine deutliche Expression einer für SETDB1 bekannten Doppelbande mit einem Molekulargewicht von etwa 143 kDa (Schultz *et al.*, 2002). Leider war keine Expression von SETDB1 im Zellkern zu beobachten, wie dies bei endogenem SETDB1 der Fall ist (Schultz *et al.*, 2002). Untersuchungen zu überexprimierten SETDB1 zeigen, dass eine starke Regulation der SETDB1 Lokalisation Ursache für diese Beobachtungen sein könnte (Cho, Park and Kang, 2013). Dabei wurde beobachtet, dass bei Überexpression sowohl der Eintritt von SETDB1 in den Zellkern stark reguliert war, als auch überschüssiges SETDB1 aus dem Zellkern exportiert wurde. In einer weiteren Publikation wird auch ein Proteasom-vermittelter Abbau von SETDB1 als Ursache diskutiert (Tachibana *et al.*, 2015).

5.4.1. Interaktion von SETDB1 mit anderen Viren

Für SETDB1 wurde bereits eine Interaktion mit HPV (Ammermann *et al.*, 2008) und HIV (Van Duyne *et al.*, 2008; Nishitsuji *et al.*, 2015) gezeigt. Bei HIV übt es einen hemmenden Einfluss auf die transaktivierende Wirkung von HIV Tat aus. SETDB1 scheint außerdem an der Latenz von HCMV beteiligt zu sein (Rauwel *et al.*, 2015) und vermittelt die Repression proviraler Elemente im Genom (Matsui *et al.*, 2010; Rowe *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2015).

5.4.2. Bestätigung der Interaktion von SETDB1 mit VP30

In Ko-Immunpräzipitationsanalysen mit SETDB1 zeigte sich nur teilweise eine Interaktion mit VP30. Hier war nur in Huh7 Zellen eine schwache Interaktion mit MARV und EBOV VP30 nachzuweisen, wobei die Interaktion mit EBOV VP30 etwas stärker ausfiel. Möglicherweise spielt hier die Klonierung des SETDB1 aus mRNA von Huh7 Zellen eine Rolle, sodass die Expression in Huh7 Zellen spezifisch bevorzugt ist. Aufgrund der beobachteten Regulation der SETDB1-Expression und Lokalisation (Cho, Park and Kang, 2013; Tachibana *et al.*, 2015) könnten hier weitere experimentelle Schritte notwendig sein, um eine Interaktion von VP30 und SETDB bei Überexpression zu ermöglichen, wie beispielsweise eine Vorbehandlung mit Leptomycin B, um einen Export von überexprimiertem SETDB1 aus dem Zellkern zu verhindern und eine physiologische Lokalisation des überexprimierten SETDB1 darzustellen.

5.4.3. Charakterisierung der Wirkung von SETDB1 in Bezug auf IFIT2

Histon-Methyltransferasen wie SETDB1 scheinen ebenfalls eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr zu spielen. So konnte für SETDB1 eine Interaktion mit IRF5 gezeigt werden (Eames *et al.*, 2012) und für die Histon-Methyltransferase SETD2 ein direkter Einfluss auf

STAT1 und die Interferon-Antwort (Chen *et al.*, 2017). Außerdem wurde vor kurzem gezeigt, dass SETDB1 in der Lage ist durch Histon-Methylierung die Transkription von Retrotransposonelementen zu verhindern (Cuellar *et al.*, 2017; Robbez-Masson, Tie and Rowe, 2017). Dies führt bei Akuter Myeloischer Leukämie zu einer allgemein reduzierten angeborenen Immunantwort. So werden durch die Methylierung weniger dsRNAs transkribiert und durch Sensoren wie RIG-I und MDA5 erkannt und weniger Typ 1 Interferon ausgeschüttet. Eine allgemein verringerte antivirale Immunantwort ist die Folge. Ein solcher Mechanismus könnte auch in einer Filovirus-Infektion eine Rolle spielen. Da zudem die PIAS-Proteine bekannte Regulatoren der Interferon-Antwort sind und SETDB1 auch eine Rolle in einem Proteinkomplex mit VP30 und PIAS-Proteinen spielen könnte, wurde die Wirkung von SETDB1 ebenfalls im IFIT2-Assay analysiert. Dabei zeigte sich eine nicht-signifikante Steigerung der Reporter-Aktivität in Gegenwart von SETDB1. Eine solche Wirkung ist nicht überraschend, da auch bei Interaktion von SETDB1 mit IRF5 kein hemmender Einfluss auf IRF5 beobachtet wurde (Eames *et al.*, 2012).

5.4.4. Einfluss von SETDB1 auf die Funktion von VP30 als Transkriptionsfaktor

Da VP30 ein wichtiger Transkriptionsfaktor während der filoviralen Transkription ist, wurde auch SETDB1 als Interaktionspartner auf seinen Einfluss in MARV- und EBOV spezifischen Minigenom-Assays getestet. Dabei zeigte sich im Gegensatz zu PIAS1 und PIAS2 kein Einfluss auf die Reporteraktivität im MARV Minigenom-Assay. Auch im EBOV spezifischen Minigenom-Assays war kein Einfluss von SETDB1 zu beobachten. Auch hier könnte die zelluläre Lokalisation des überexprimierten SETDB1 eine funktionelle Bedeutung spielen. Es könnte auch sein, dass SETDB1 ähnlich wie bei IRF5 zwar mit VP30 interagiert, aber keinen direkten Einfluss auf VP30 hat.

SETDB1 könnte eine Rolle in anderen Phasen des viralen Replikationszyklus spielen. So wurde SETDB1 als ein wichtiger zellulärer Wirts-Faktor für den Eintritt von Filoviren identifiziert, mit Hilfe von rekombinantem EBOV GP exprimierendem VSV (rVSV-GP-EBOV) (Carette *et al.*, 2011). Daher liegt es nahe, dass SETDB1 eine Funktion im Zusammenhang mit GP während des Viruseintritts spielen könnte. Hier müssen weitere Untersuchungen zum Zelleintritt von EBOV und MARV und zu GP und VP30 folgen.

Des Weiteren könnten zusätzliche Faktoren für die Funktion von SETDB1 notwendig sein. Beispielsweise könnte SETDB1 eine Rolle in der Abschaltung bestimmter Gene durch Silencing spielen. Dabei könnten zelluläre Gene mögliche Ziele sein. So ist SETDB1 in einem Komplex aus ZNF274/TRIM28/SETDB1 (Zink-Finger-Proteine/Sumo-Ligase/Histonmethyltransferase) in der Lage, durch Histonmethylierung transkriptionell aktive Bereiche zu stabilisieren (Herz, Garruss and Shilatifard, 2013; Valle-García *et al.*, 2016). Ein

solcher Mechanismus wäre auch für VP30 mit seiner Zink-Finger-Domäne und einigen Sumo-Ligasen wie PIAS oder TRIM6 denkbar (Bharaj *et al.*, 2017).

Daneben sollte auch eine Methylierung von Nicht-Histon-Proteinen in Betracht gezogen werden. So wurde beispielsweise für Influenza gezeigt, dass die Acetylierung von NP, analog zur Acetylierung von Histonen, einen Einfluss auf das Viruswachstum und die Virusreplikation hat (Giese *et al.*, 2017). Ein ähnlicher Mechanismus konnte auch für die SETDB1-vermittelte Methylierung des HIV Tat Proteins beobachtet werden (Van Duyn *et al.*, 2008). So interagiert SETDB1 mit Tat, methyliert dieses und führt zu einer reduzierten Transaktivierung der Tat-vermittelten viralen Transkription von HIV LTRs.

5.5. Mögliche Rollen von RBBP6 und HECTD1 im filoviralen Replikationszyklus

5.5.1. RBBP6

Bei RBBP6 handelt es sich um eine E3-Ubiquitin-Ligase, die in der vorliegenden Arbeit als Interaktionspartner von VP30 im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay detektiert wurde. Vor kurzem wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass RBBP6 mit EBOV VP30 interagiert und einen negativen Einfluss auf die virale RNA-Synthese ausübt (unveröffentlichte Daten, Jyoti Batra, AG Basler, Center for Microbial Pathogenesis, Atlanta (USA)). In der Zelle ist RBBP6 in der Lage durch Ubiquitylierung den proteasomalen Abbau von verschiedenen Proteinen zu induzieren (Chibi *et al.*, 2008) und die zelluläre DNA-Replikation zu kontrollieren (Miotto *et al.*, 2014). Welche Rolle RBBP6 für MARV spielen könnte müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5.5.2. HECTD1

Bei HECTD1 handelt es sich wie bei RBBP6 um eine E3-Ubiquitin-Ligase, die in dieser Arbeit mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Assay erstmals als Interaktionspartner von MARV VP30 identifiziert wurde. Bisher ist nur wenig über HECTD1 und seine Funktionen bekannt. Es spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Kopf-Mesenchyms (Zohn, Anderson and Niswander, 2007) und ist an der Regulation von Zelladhäsionen beteiligt (Li *et al.*, 2013; Deng and Huang, 2014). In Bezug auf Filoviren ist interessant, dass HECTD1 mit IQGAP1 interagiert und dessen Proteinexpression durch Ubiquitin-abhängige Degradation kontrolliert (Shen *et al.*, 2017). Für IQGAP1 wurde gezeigt, dass es eine wichtige Rolle in der Filovirus-Infektion spielt. So interagiert IQGAP1 mit EBOV VP40 und ist für eine Freisetzung von EBOV Virus-ähnlichen Partikeln notwendig (Lu *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass IQGAP1 in MARV Einschlusskörpern und am Ende von Nukleokapsiden lokalisiert ist und dabei eine wichtige Rolle für die Bewegung von Nukleokapsiden und für die Freisetzung von MARV Partikeln spielt (Dolnik *et al.*, 2014, 2015). Hier wurde eine Interaktion von MARV NP mit

Tsg101 gezeigt, welches wiederum mit IQGAP1 interagiert. Hier müssen in Zukunft weitere Untersuchungen zur Bedeutung der gefundenen Interaktionen folgen.

5.6. Abschlussbetrachtungen und Arbeitsmodell für die Interaktion von MARV VP30 und PIAS

In dieser Arbeit wurden die Proteine PIAS1, PIAS2, SETDB1, RBBP6 und HECTD1 als neue Interaktionspartner des MARV VP30 identifiziert. Es wurde gezeigt, dass PIAS1 und PIAS2 ebenfalls mit EBOV VP30 interagieren. In der Vergangenheit wurde PIAS1 bereits als Interaktionspartner des EBOV VP35 identifiziert (Chang *et al.*, 2009), sowie SETDB1 als Faktor für den Zelleintritt von EBOV identifiziert (Carette *et al.*, 2011).

PIAS1, PIAS2 und SETDB1 wurden im Verlauf dieser Arbeit auf ihren Einfluss im viralen Replikationszyklus hin untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass PIAS1 und PIAS2 in der Lage sind die Interferon-Signalkaskade und IFIT2 zu hemmen, welches ein wichtiges ISG darstellt, das durch Filoviren stark reguliert wird (Basler *et al.*, 2000, 2003; Edwards *et al.*, 2016; Yen and Basler, 2016). Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass PIAS1 und PIAS2 bei Überexpression die MARV Transkription und Replikation steigern, während sie in Abwesenheit von PIAS2 in PIAS2-KO Zellen verringert ist.

Die gewonnenen Daten wurden in einem Arbeitsmodell zur Interaktion von MARV VP30 und PIAS2 zusammengefasst (Abbildung 24).

PIAS2 β ist in der Zelle (Abbildung 24A), vor allem im Zellkern z. T. jedoch auch im Zytoplasma lokalisiert. MARV VP30 liegt vor allem im Zytoplasma vor, ist aber z.T. auch im Zellkern zu finden, wie es in dieser Arbeit beobachtet wurde. Zur Interaktion kommt es über den N-Terminus von VP30 mit PIAS2 (Abbildung 24A, E). Fehlt der N-Terminus von VP30, so kommt es nicht zur Interaktion. Die intrazelluläre Lokalisation der Interaktion ist bislang nicht genau bestimmt. Daten aus der Immunfluoreszenzanalyse von PIAS β und VP30 deuten darauf hin, dass die Interaktion im Zellkern stattfinden könnte. PIAS2 führt im Kern zur Reduktion der Aktivität von ISGs, wie IFIT2 bei Interferon- β Stimulation (Abbildung 24B). Im Zytoplasma kommt es bei einer Infektion mit MARV zur Ausbildung von Einschlusskörpern, welche den Ort der Transkription und Replikation darstellen. PIAS2 führt zu einer gesteigerten Transkription und Replikation und leicht gesteigerten Virusmehrung in der Infektion (Abbildung 24B). Zwei mögliche Ursachen kommen dafür in Betracht: 1. PIAS2 hemmt die IFIT2-Aktivierung, welches seinerseits eine Hemmung der Translation bewirkt und an der Erkennung von viralen RNAs beteiligt ist. 2. PIAS steigert die transkriptionsaktivierende Wirkung von VP30.

Fehlt PIAS2 (Abbildung 24C), so kommt es nicht zur Interaktion und in der Folge zu einer verringerten Transkription und Replikation und einer leicht verringerten Virusvermehrung (Abbildung 24D).

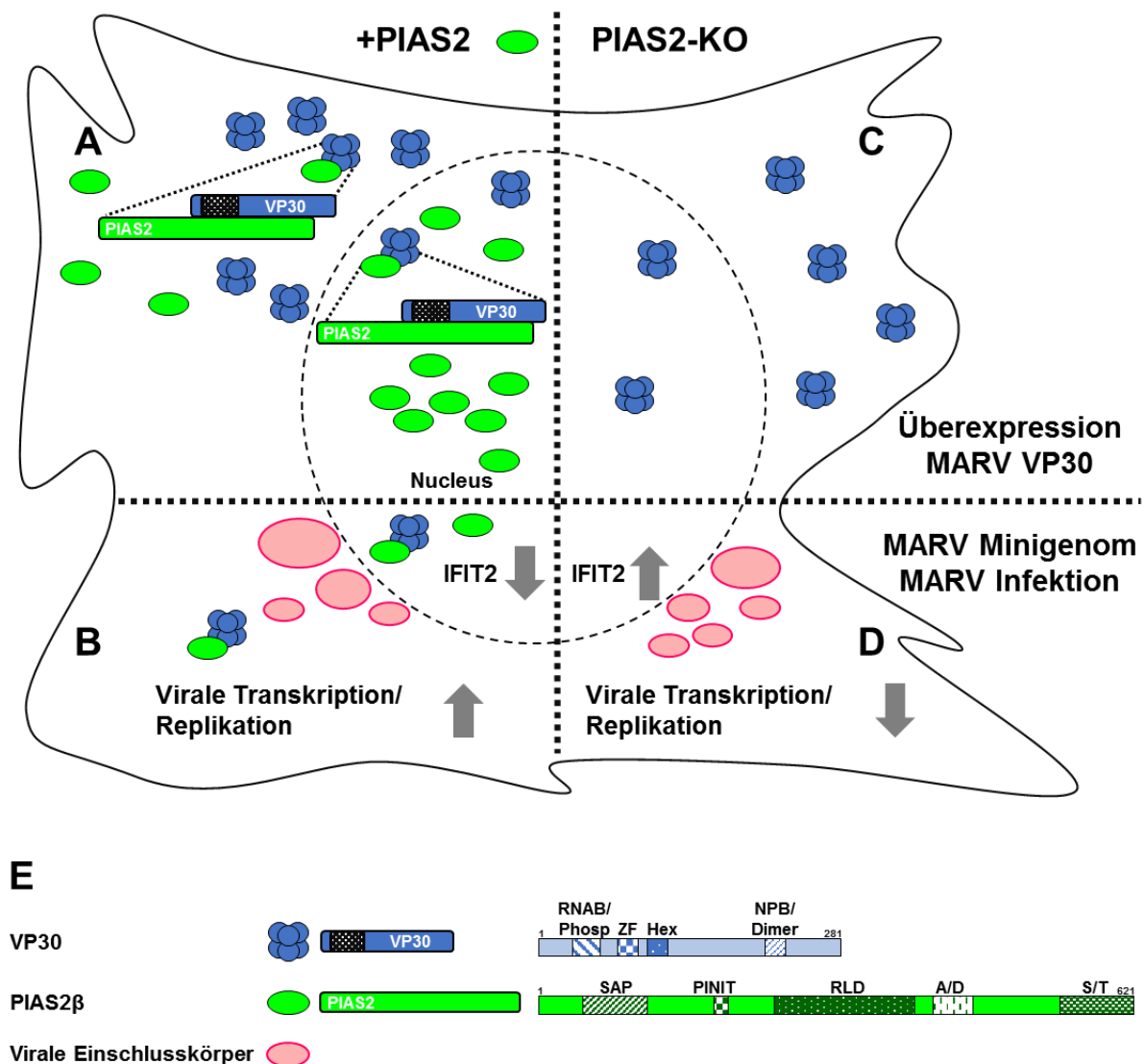


Abbildung 24 Arbeitsmodell für die Interaktion von MARV VP30 und PIAS2.

Auswirkungen von PIAS2 β auf MARV Minigenom-Assay und MARV Infektion. **A** Interaktion und Lokalisation von MARV VP30 und PIAS2 β . MARV VP30 ist vor allem im Zytoplasma zu finden, in geringen Mengen auch im Zellkern. PIAS2 β ist bei Überexpression vor allem im Zellkern zu finden, z. T. auch im Zytoplasma. Die Interaktion erfolgt über den N-Terminus von MARV VP30 mit PIAS2 β . **B** Wirkung von PIAS2 β . PIAS2 β führt im Kern zu Verringerung der IFIT2-Aktivität. Die Transkription und Replikation von MARV ist gesteigert. **C** Fehlen von PIAS2 β . **D** Das Fehlen von PIAS2 β führt zu reduzierter Transkription und Replikation. **E** Legende zu A, B, C, D. VP30: dargestellt in blau als hexameres Protein. Wichtige Domänen sind gekennzeichnet. RNAB/Phosp: RNA-Bindedomäne/Phosphorylierungsstellen, ZF: Zink-Finger-Motiv, Hex: Oligomerisierungsdomäne, dient der Hexamerisierung, NPB/Dimer: NP-Bindedomäne, dient der Dimerisierung. PIAS2 β : Dargestellt in grün. Wichtige Domänen sind gekennzeichnet. SAP: Gerüst-Anlagerungs-Faktor A (SAFA) und SAFA, Apoptotische Chromatin-Condensations Inducer in Nucleus (ACINUS) und PIAS Domäne, PINIT: PINIT-Aminosäuremotiv, RLD: RING-Finger-ähnliche Zink-Bindedomäne, A/D: Stark saure Domäne S/T: Serin-Threonin-reiche Region. Virale Einschlusskörper: Dargestellt in Rot. Sie stellen den Ort der Transkription/Replikation der Viren dar.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstreichen im Zusammenhang mit anderen Publikationen (Chang *et al.*, 2009; Carette *et al.*, 2011) die Bedeutung der in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner des MARV VP30 für den filoviralen Replikationszyklus. Im

nächsten Schritt muss die Lokalisation der PIAS-VP30-Interaktion in der Zelle mit Hilfe einer Zell- und Organell-Fraktionierung und die Art der Interaktion genauer untersucht werden. Des Weiteren sollte eine mögliche Sumoylierung von viralen und zellulären Proteinen durch die PIAS-Proteine analysiert werden und ob während der MARV Infektion eine Kompensation durch andere PIAS-Proteine stattfindet. Eine weitere interessante Frage ist, ob VP30 einen Einfluss auf den Viruseintritt hat und auf das Glykoprotein GP hat. Auch dies sollte mit Hilfe von Virus-Eintritts-Assays weiter untersucht werden.

Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein Proteinkomplex aus einem Teil der gefundenen Proteine eine Rolle spielt, da diese Interaktionen untereinander zeigen (5.2.2, Abbildung 22).

6. Zusammenfassung

Marburg-Virus (MARV) und Ebola-Virus (EBOV), Mitglieder der Virusfamilie der Filoviridae, lösen schwere, oft tödlich verlaufende Erkrankungen im Menschen und nicht-menschlichen Primaten aus. Der EBOV Ausbruch in Westafrika von 2014-2016 mit mehr als 28.000 Fällen und 11.000 Toten hat gezeigt, wie wichtig detailliertes Wissen über die Infektionsverläufe ist, um neue Impfstoffe und antivirale Medikamente entwickeln zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue zelluläre Interaktionspartner des MARV VP30 identifiziert, die im Replikationszyklus des Virus eine wichtige Rolle spielen. Unter Verwendung von Hefe-Zwei-Hybrid-Assays konnten fünf neue Interaktionspartner des Marburg-Virus Proteins VP30 identifiziert werden, bei denen es sich um die Proteine PIAS1, PIAS2, SETDB1, RBBP6 und HECDT1 handelt. PIAS1, PIAS2 und SETDB1 wurden ausgewählt, kloniert und weiter charakterisiert. Die Interaktion von PIAS1 und PIAS2 mit MARV VP30 wurde in humanen Zellen mit Hilfe von Ko-Immunpräzipitationen bestätigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass beide Proteine auch mit EBOV VP30 interagieren. Die Interaktion von MARV VP30 und SETDB1 wurde in Huh7-Zellen bestätigt.

Für die Interaktion von MARV VP30 und PIAS2 β wurde gezeigt, dass der N-Terminus hierfür verantwortlich ist, wobei die Homooligomerisierungsdomäne keine Rolle spielt.

Da sowohl MARV als auch EBOV VP30 mit PIAS2 β interagieren, ist zu vermuten, dass ein konservierter Bereich beider Proteine die Interaktion vermittelt. Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz bestätigen die Ergebnisse und legen eine Interaktion von MARV VP30 und PIAS2 β im Zellkern nahe.

Bei den PIAS-Proteinen handelt es sich um Inhibitoren des JAK-STAT-Signalkaskade, die als E3-Sumo-Ligase wirken und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren regulieren können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PIAS1 und PIAS2 in der Lage sind die Aktivierung von IFIT2 zu verhindern, bei dem es sich um ein wichtiges Interferon-stimuliertes antivirales Protein handelt, das auch in Filovirusinfektionen inhibiert ist.

Außerdem wurde gezeigt, dass PIAS1 und PIAS2 in der Lage sind die Transkription und Replikation in Marburg-Virus-spezifischen Minigenom-Assays zu steigern. Im Gegensatz dazu war die Transkription und Replikation in Abwesenheit von PIAS2 in Minigenom-Assays und während der Infektion von PIAS2-KO-Zellen verringert. Dies deutet darauf hin, dass PIAS1 und PIAS2 einen fördernden Einfluss auf eine MARV-Infektion ausüben könnten. Weitere Analysen müssen zeigen, ob möglicherweise ein Proteinkomplex aus Teilen der gefundenen Interaktionspartner eine Rolle spielt, da Interaktionen der gefundenen Proteine untereinander dies nahelegen.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten und charakterisierten Interaktionspartner von VP30 sind relevant für MARV und EBOV und für die virale Transkription bedeutsam. Die weitere Erforschung des genauen Wirkmechanismus ist von zentraler Bedeutung.

7. Summary

Marburg virus (MARV) and Ebola virus (EBOV) belong to the family *filoviridae* and cause a severe, often fatal disease in humans and non-human primates. The Ebola virus outbreak in West Africa 2014-2016 underscored the need for a deeper understanding of the EBOV life cycle.

The aim of this study was to determine cellular proteins that interact with MARV VP30 and play an important role during MARV infection. Yeast two-hybrid analyses identified five different proteins as cellular interaction partners of MARV VP30, namely PIAS1, PIAS2, SETDB1, RBBP6 and HECTD1.

PIAS1, PIAS2, and SETDB1 were cloned and the respective proteins were characterized. Coimmunoprecipitation analyses confirmed the interaction of PIAS1, PIAS2 and SETDB1 with VP30 in human cells. For SETDB1 only in Huh7 cells an interaction was shown. The interaction of MARV VP30 with PIAS2 β was shown to depend on the N-Terminus of VP30. Colocalization studies of VP30 and PIAS2 β led to the assumption that the interaction might take place in the nucleus. Furthermore, it was shown that PIAS1 and PIAS2 also interact with EBOV VP30.

Since MARV and EBOV VP30 interact with the same proteins it is likely to assume that a conserved domain may be responsible for this interaction.

PIAS proteins were identified as inhibitors of STAT-signaling, are E3-sumo-ligases and regulate several transcription factors. In the present study it was shown, that PIAS1 and PIAS2 downregulate the interferon-stimulated antiviral Protein IFIT2, which is not activated during filovirus infections.

MARV-specific minigenome-assays showed that PIAS1 and PIAS2 enhance viral transcription and replication. In PIAS2 knockout cells viral transcription and replication of a MARV-specific minigenome and the MARV genome during infection is diminished. Based on these results we assume that PIAS proteins play a supportive role during Marburg virus infection, by inhibiting interferon signaling and enhancing viral transcription. Future studies need to show, whether a protein complex consisting of several of the identified interaction partner plays a role during infection, since interaction among the found proteins suggests this.

This study shows, that the identified and characterized interactors are relevant for MARV and EBOV and for viral transcription. Further studies on the exact underlying mechanisms are therefore of great importance.

8. Literaturverzeichnis

Aggaard, L. *et al.* (1999) 'Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 18(7), pp. 1923–38. doi: 10.1093/emboj/18.7.1923.

Adjemian, J. *et al.* (2011) 'Outbreak of Marburg Hemorrhagic Fever Among Miners in Kamwenge and Ibanda Districts, Uganda, 2007', *The Journal of Infectious Diseases*, 204(suppl_3), pp. S796–S799. doi: 10.1093/infdis/jir312.

Afonso, C. L. *et al.* (2016) 'Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016.', *Archives of virology*. NIH Public Access, 161(8), pp. 2351–60. doi: 10.1007/s00705-016-2880-1.

Ajelli, M. *et al.* (2015) 'The 2014 Ebola virus disease outbreak in Pujehun, Sierra Leone: epidemiology and impact of interventions.', *BMC medicine*, 13(1), p. 281. doi: 10.1186/s12916-015-0524-z.

Albariño, C. G. *et al.* (2013) 'Genomic analysis of filoviruses associated with four viral hemorrhagic fever outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012', *Virology*, 442(2), pp. 97–100. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.014.

Aleksandrowicz, P. *et al.* (2011) 'Ebola Virus Enters Host Cells by Macropinocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis', *The Journal of Infectious Diseases*, 204(suppl_3), pp. S957–S967. doi: 10.1093/infdis/jir326.

Alves, D. A. *et al.* (2010) 'Aerosol Exposure to the Angola Strain of Marburg Virus Causes Lethal Viral Hemorrhagic Fever in *Cynomolgus* Macaques', *Veterinary Pathology*, 47(5), pp. 831–851. doi: 10.1177/0300985810378597.

Ammermann, I. *et al.* (2008) 'Inhibition of Transcription and DNA Replication by the Papillomavirus E8^{E2C} Protein Is Mediated by Interaction with Corepressor Molecules', *Journal of Virology*, 82(11), pp. 5127–5136. doi: 10.1128/JVI.02647-07.

Andersson, B. S. *et al.* (1987) 'Ph-positive chronic myeloid leukemia with near-haploid conversion in vivo and establishment of a continuously growing cell line with similar cytogenetic pattern.', *Cancer genetics and cytogenetics*, 24(2), pp. 335–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3466682> (Accessed: 28 March 2018).

Arora, T. *et al.* (2003) 'PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(24), pp. 21327–21330. doi: 10.1074/jbc.C300119200.

Ayyanathan, K. *et al.* (2003) 'Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation', *Genes & Development*, 17(15), pp. 1855–1869. doi: 10.1101/gad.1102803.

Bamberg, S. *et al.* (2005) 'VP24 of Marburg Virus Influences Formation of Infectious Particles', *Journal of Virology*, 79(21), pp. 13421–13433. doi: 10.1128/JVI.79.21.13421-13433.2005.

Banadyga, L. *et al.* (2017) 'Ebola virus VP24 interacts with NP to facilitate nucleocapsid assembly and genome packaging', *Scientific Reports*, 7(1), p. 7698. doi: 10.1038/s41598-017-08167-8.

Barski, A. *et al.* (2007) 'High-resolution profiling of histone methylations in the human genome.', *Cell*, 129(4), pp. 823–37. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.009.

Baseler, L. *et al.* (2017) 'The Pathogenesis of Ebola Virus Disease * EBOV: Ebola virus', *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 12, pp. 387–418. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-

100506.

Basler, C. F. *et al.* (2000) 'The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), pp. 12289–12294. doi: 10.1073/pnas.220398297.

Basler, C. F. *et al.* (2003) 'The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3.', *Journal of virology*, 77(14), pp. 7945–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829834> (Accessed: 3 December 2017).

Bausch, D. G. *et al.* (2006) 'Marburg Hemorrhagic Fever Associated with Multiple Genetic Lineages of Virus', *New England Journal of Medicine*, 355(9), pp. 909–919. doi: 10.1056/NEJMoa051465.

Bautista, D. *et al.* (2007) 'Liver expression of proteins controlling interferon-mediated signalling as predictive factors in the response to therapy in patients with hepatitis C virus infection', *The Journal of Pathology*, 213(3), pp. 347–355. doi: 10.1002/path.2214.

Baz-Martínez, M. *et al.* (2016) 'Regulation of Ebola virus VP40 matrix protein by SUMO', *Scientific Reports*, 6(1), p. 37258. doi: 10.1038/srep37258.

Becker, S. *et al.* (1992) 'Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide?', *Medical microbiology and immunology*, 181(1), pp. 43–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579085> (Accessed: 17 December 2017).

Becker, S. *et al.* (1994) 'The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated', *Journal of General Virology*, 75(4), pp. 809–818. doi: 10.1099/0022-1317-75-4-809.

Becker, S. *et al.* (1998) 'Interactions of Marburg Virus Nucleocapsid Proteins', *Virology*, 249(2), pp. 406–417. doi: 10.1006/viro.1998.9328.

Becker, S., Klenk, H. D. and Mühlberger, E. (1996) 'Intracellular transport and processing of the Marburg virus surface protein in vertebrate and insect cells.', *Virology*, 225(1), pp. 145–55. doi: 10.1006/viro.1996.0582.

Becker, S. and Mühlberger, E. (1999) 'Co- and posttranslational modifications and functions of Marburg virus proteins.', *Current topics in microbiology and immunology*, 235, pp. 23–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893376> (Accessed: 2 December 2017).

Becker, S., Spiess, M. and Klenk, H.-D. (1995) 'The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus', *Journal of General Virology*, 76(2), pp. 393–399. doi: 10.1099/0022-1317-76-2-393.

Bharaj, P. *et al.* (2017) 'The Host E3-Ubiquitin Ligase TRIM6 Ubiquitinates the Ebola Virus VP35 Protein and Promotes Virus Replication', *Journal of Virology*. Edited by D. S. Lyles, 91(18), pp. e00833-17. doi: 10.1128/JVI.00833-17.

Bharat, T. A. M. *et al.* (2011) 'Cryo-Electron Tomography of Marburg Virus Particles and Their Morphogenesis within Infected Cells', *PLoS Biology*. Edited by F. A. Rey, 9(11), p. e1001196. doi: 10.1371/journal.pbio.1001196.

Bharat, T. A. M. *et al.* (2012) 'Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), pp. 4275–4280. doi: 10.1073/pnas.1120453109.

Biedenkopf, N. *et al.* (2013) 'Phosphorylation of Ebola Virus VP30 Influences the Composition of the Viral Nucleocapsid Complex', *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), pp. 11165–11174. doi: 10.1074/jbc.M113.461285.

Biedenkopf, N. *et al.* (2016) 'RNA Binding of Ebola Virus VP30 Is Essential for Activating

- Viral Transcription', *Journal of Virology*. Edited by D. S. Lyles, 90(16), pp. 7481–7496. doi: 10.1128/JVI.00271-16.
- Biedenkopf, N. *et al.* (2017) 'The natural compound silvestrol is a potent inhibitor of Ebola virus replication', *Antiviral Research*, 137, pp. 76–81. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.11.011.
- Biedenkopf, N., Lier, C. and Becker, S. (2016) 'Dynamic Phosphorylation of VP30 Is Essential for Ebola Virus Life Cycle', *Journal of Virology*. Edited by D. S. Lyles, 90(10), pp. 4914–4925. doi: 10.1128/JVI.03257-15.
- Bohren, K. M. *et al.* (2004) 'A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus.', *The Journal of biological chemistry*, 279(26), pp. 27233–8. doi: 10.1074/jbc.M402273200.
- Boisen, M. L. *et al.* (2015) 'Development of Prototype Filovirus Recombinant Antigen Immunoassays', *Journal of Infectious Diseases*, 212(suppl 2), pp. S359–S367. doi: 10.1093/infdis/jiv353.
- Bosio, C. M. *et al.* (2003) 'Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation.', *The Journal of infectious diseases*, 188(11), pp. 1630–8. doi: 10.1086/379199.
- Bowen, E. T. *et al.* (1977) 'Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent.', *Lancet (London, England)*, 1(8011), pp. 571–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/65662> (Accessed: 16 December 2017).
- Brainard, J. *et al.* (2016) 'Presence and Persistence of Ebola or Marburg Virus in Patients and Survivors: A Rapid Systematic Review', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by D. G. Bausch. Public Library of Science, 10(2), p. e0004475. doi: 10.1371/journal.pntd.0004475.
- Brauburger, K. *et al.* (2012) 'Forty-five years of Marburg virus research.', *Viruses*, 4(10), pp. 1878–927. doi: 10.3390/v4101878.
- Brès, P. (1978) '[The epidemic of Ebola haemorrhagic fever in Sudan and Zaire, 1976: introductory note].', *Bulletin of the World Health Organization*, 56(2), p. 245. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/307454> (Accessed: 15 March 2018).
- Brown, J. R. *et al.* (2016) 'SUMO Ligase Protein Inhibitor of Activated STAT1 (PIAS1) Is a Constituent Promyelocytic Leukemia Nuclear Body Protein That Contributes to the Intrinsic Antiviral Immune Response to Herpes Simplex Virus 1', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Sandri-Goldin, 90(13), pp. 5939–5952. doi: 10.1128/JVI.00426-16.
- Bukreyev, A. *et al.* (1993) 'The GP-protein of Marburg virus contains the region similar to the "immunosuppressive domain" of oncogenic retrovirus P15E proteins.', *FEBS letters*, 323(1–2), pp. 183–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8495737> (Accessed: 21 March 2018).
- Burk, R. *et al.* (2016) 'Neglected filoviruses', *FEMS Microbiology Reviews*. Edited by U. Greber, 40(4), pp. 494–519. doi: 10.1093/femsre/fuw010.
- Burke, J., Declercq, R. and Ghysebrechts, G. (1978) 'Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Report of an international commission', *Bulletin of the World Health Organization*. doi: 1978;56(2):271-293.
- Cárdenas, W. B. *et al.* (2006) 'Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling.', *Journal of virology*, 80(11), pp. 5168–78. doi: 10.1128/JVI.02199-05.
- Carette, J. E. *et al.* (2009) 'Haploid genetic screens in human cells identify host factors used

by pathogens.', *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), pp. 1231–5. doi: 10.1126/science.1178955.

Carette, J. E. *et al.* (2011) 'Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1.', *Nature*, 477(7364), pp. 340–3. doi: 10.1038/nature10348.

CDC, Center for Disease Control and Prevention (2014) *Outbreaks Chronology: Marburg Hemorrhagic Fever*. Available at: <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/outbreaks/chronology.html>.

CDC, C. for D. C. and P. (2017) *Outbreaks Chronology: Ebola Virus Disease*. Available at: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009) 'Imported case of Marburg hemorrhagic fever - Colorado, 2008.', *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 58(49), pp. 1377–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20019654> (Accessed: 13 April 2018).

Ceol, C. J. *et al.* (2011) 'The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset', *Nature*, 471(7339), pp. 513–517. doi: 10.1038/nature09806.

Chang, L.-K. *et al.* (2004) 'Post-translational Modification of Rta of Epstein-Barr Virus by SUMO-1', *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), pp. 38803–38812. doi: 10.1074/jbc.M405470200.

Chang, T. H. *et al.* (2009) 'Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery', *PLoS Pathogens*. Edited by C. F. Basler, 5(6), p. e1000493. doi: 10.1371/journal.ppat.1000493.

Chatel-Chaix, L. *et al.* (2013) 'A Host YB-1 Ribonucleoprotein Complex Is Hijacked by Hepatitis C Virus for the Control of NS3-Dependent Particle Production', *Journal of Virology*, 87(21), pp. 11704–11720. doi: 10.1128/JVI.01474-13.

Chen, H. and Qi, L. (2010) 'SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1.', *The Biochemical journal*, 429(1), pp. 95–102. doi: 10.1042/BJ20100193.

Chen, K. *et al.* (2017) 'Methyltransferase SETD2-Mediated Methylation of STAT1 Is Critical for Interferon Antiviral Activity', *Cell*, 170(3), p. 492–506.e14. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.042.

Cheng, J. *et al.* (2004) 'Down-regulation of SHP1 and up-regulation of negative regulators of JAK/STAT signaling in HTLV-1 transformed cell lines and freshly transformed human peripheral blood CD4+ T-cells.', *Leukemia research*, 28(1), pp. 71–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630083> (Accessed: 28 February 2018).

Chibi, M. *et al.* (2008) 'RBBP6 interacts with multifunctional protein YB-1 through its RING finger domain, leading to ubiquitination and proteosomal degradation of YB-1.', *Journal of molecular biology*, 384(4), pp. 908–16. doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.060.

Cho, S., Park, J. S. and Kang, Y.-K. (2011) 'Dual Functions of Histone-Lysine N - Methyltransferase Setdb1 Protein at Promyelocytic Leukemia-Nuclear Body (PML-NB)', *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), pp. 41115–41124. doi: 10.1074/jbc.M111.248534.

Cho, S., Park, J. S. and Kang, Y.-K. (2013) 'Regulated nuclear entry of over-expressed Setdb1', *Genes to Cells*, 18(8), pp. 694–703. doi: 10.1111/gtc.12068.

Christen, V. *et al.* (2007) 'Inhibition of Alpha Interferon Signaling by Hepatitis B Virus', *Journal of Virology*, 81(1), pp. 159–165. doi: 10.1128/JVI.01292-06.

Chung, C. D. *et al.* (1997) 'Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3.', *Science (New York, N.Y.)*, 278(5344), pp. 1803–5. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9388184> (Accessed: 19 December 2017).

Colebunders, R. *et al.* (2007) 'Marburg Hemorrhagic Fever in Durba and Watsa, Democratic Republic of the Congo: Clinical Documentation, Features of Illness, and Treatment', *The Journal of Infectious Diseases*, 196(s2), pp. S148–S153. doi: 10.1086/520543.

Collins, P. L. *et al.* (1996) 'Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), pp. 81–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8552680> (Accessed: 21 March 2018).

Collins, P. L. *et al.* (2015) 'The histone methyltransferase SETDB1 represses endogenous and exogenous retroviruses in B lymphocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), pp. 8367–8372. doi: 10.1073/pnas.1422187112.

Conn, K. L. *et al.* (2016) 'Novel Role for Protein Inhibitor of Activated STAT 4 (PIAS4) in the Restriction of Herpes Simplex Virus 1 by the Cellular Intrinsic Antiviral Immune Response', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Sandri-Goldin, 90(9), pp. 4807–4826. doi: 10.1128/JVI.03055-15.

Côté, M. *et al.* (2011) 'Small molecule inhibitors reveal Niemann–Pick C1 is essential for Ebola virus infection', *Nature*, 477(7364), pp. 344–348. doi: 10.1038/nature10380.

Cuchet-Lourenço, D. *et al.* (2011) 'SUMO Pathway Dependent Recruitment of Cellular Repressors to Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes', *PLoS Pathogens*. Edited by K. L. Mossman, 7(7), p. e1002123. doi: 10.1371/journal.ppat.1002123.

Cuellar, T. L. *et al.* (2017) '---Silencing of retrotransposons by SETDB1 inhibits the interferon response in acute myeloid leukemia--', *The Journal of Cell Biology*, 216(11), pp. 3535–3549. doi: 10.1083/jcb.201612160.

Dedkov, V. G. *et al.* (2016) 'Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for the detection of Ebola virus (Zaire) during an Ebola outbreak in Guinea in 2014–2015', *Journal of Virological Methods*, 228, pp. 26–30. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.007.

Deen, G. F. *et al.* (2017) 'Ebola RNA Persistence in Semen of Ebola Virus Disease Survivors — Final Report', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 377(15), pp. 1428–1437. doi: 10.1056/NEJMoa1511410.

Deng, S. and Huang, C. (2014) 'E3 ubiquitin ligases in regulating stress fiber, lamellipodium, and focal adhesion dynamics', *Cell Adhesion & Migration*, 8(1), pp. 49–54. doi: 10.4161/cam.27480.

Diamond, M. S. and Farzan, M. (2013) 'The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins', *Nature Reviews Immunology*, 13(1), pp. 46–57. doi: 10.1038/nri3344.

DiCarlo, A. *et al.* (2007) 'Nucleocapsid formation and RNA synthesis of Marburg virus is dependent on two coiled coil motifs in the nucleoprotein', *Virology Journal*, 4(1), p. 105. doi: 10.1186/1743-422X-4-105.

Diehl, W. E. *et al.* (2016) 'Ebola Virus Glycoprotein with Increased Infectivity Dominated the 2013–2016 Epidemic', *Cell*, 167(4), p. 1088–1098.e6. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.014.

Dietzel, E. *et al.* (2017) 'Functional Characterization of Adaptive Mutations during the West African Ebola Virus Outbreak', *Journal of Virology*. Edited by D. S. Lyles, 91(2), pp. e01913-16. doi: 10.1128/JVI.01913-16.

Dolnik, O. *et al.* (2010) 'Tsg101 Is Recruited by a Late Domain of the Nucleocapsid Protein To Support Budding of Marburg Virus-Like Particles', *Journal of Virology*, 84(15), pp. 7847–7856. doi: 10.1128/JVI.00476-10.

- Dolnik, O. *et al.* (2014) 'Interaction with Tsg101 Is Necessary for the Efficient Transport and Release of Nucleocapsids in Marburg Virus-Infected Cells', *PLoS Pathogens*. Edited by C. F. Basler, 10(10), p. e1004463. doi: 10.1371/journal.ppat.1004463.
- Dolnik, O. *et al.* (2015) 'Marburg virus inclusions: A virus-induced microcompartment and interface to multivesicular bodies and the late endosomal compartment', *European Journal of Cell Biology*, 94(7–9), pp. 323–331. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.05.006.
- Drosten, C. *et al.* (2002) 'Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR.', *Journal of clinical microbiology*, 40(7), pp. 2323–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089242> (Accessed: 18 March 2018).
- Duechting, A. *et al.* (2008) 'Human Parvovirus B19 NS1 Protein Modulates Inflammatory Signaling by Activation of STAT3/PIAS3 in Human Endothelial Cells', *Journal of Virology*, 82(16), pp. 7942–7952. doi: 10.1128/JVI.00891-08.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M. and McDonald, J. H. (2011) 'A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(4), pp. C723–C742. doi: 10.1152/ajpcell.00462.2010.
- Duval, D. *et al.* (2003) 'The "PINIT" motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L.', *FEBS letters*, 554(1–2), pp. 111–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14596924> (Accessed: 19 April 2018).
- Van Duyne, R. *et al.* (2008) 'Lysine methylation of HIV-1 Tat regulates transcriptional activity of the viral LTR', *Retrovirology*, 5(1), p. 40. doi: 10.1186/1742-4690-5-40.
- Eames, H. L. *et al.* (2012) 'KAP1/TRIM28: An inhibitor of IRF5 function in inflammatory macrophages', *Immunobiology*, 217(12), pp. 1315–1324. doi: 10.1016/j.imbio.2012.07.026.
- Edwards, M. R. *et al.* (2014) 'The Marburg Virus VP24 Protein Interacts with Keap1 to Activate the Cytoprotective Antioxidant Response Pathway', *Cell Reports*, 6(6), pp. 1017–1025. doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.043.
- Edwards, M. R. *et al.* (2016) 'Differential Regulation of Interferon Responses by Ebola and Marburg Virus VP35 Proteins', *Cell Reports*, 14(7), pp. 1632–1640. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.049.
- El-Saadany, S. *et al.* (2013) 'The role of hepatic expression of STAT1, SOCS3 and PIAS1 in the response of chronic hepatitis C patients to therapy.', *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*, 27(2), pp. e13–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472246> (Accessed: 22 February 2018).
- Enterlein, S. *et al.* (2006) 'Rescue of Recombinant Marburg Virus from cDNA Is Dependent on Nucleocapsid Protein VP30', *Journal of Virology*, 80(2), pp. 1038–1043. doi: 10.1128/JVI.80.2.1038-1043.2006.
- Enterlein, S. *et al.* (2009) 'The marburg virus 3' noncoding region structurally and functionally differs from that of ebola virus.', *Journal of virology*, 83(9), pp. 4508–19. doi: 10.1128/JVI.02429-08.
- Fei, Q. *et al.* (2015) 'Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of p53', *Nature Communications*, 6, p. 8651. doi: 10.1038/ncomms9651.
- Feldmann, H. *et al.* (1991) 'Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus.', *Virology*, 182(1), pp. 353–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2024471> (Accessed: 21 March 2018).
- Feldmann, H. *et al.* (1992) 'Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and

- regulatory elements of the replication cycle.', *Virus research*, 24(1), pp. 1–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1626422> (Accessed: 19 March 2018).
- Feldmann, H. *et al.* (1994) 'Characterization of Filoviruses Based on Differences in Structure and Antigenicity of the Virion Glycoprotein', *Virology*, 199(2), pp. 469–473. doi: 10.1006/viro.1994.1147.
- Feldmann, H. *et al.* (1996) 'Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages.', *Journal of virology*, 70(4), pp. 2208–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642644> (Accessed: 18 March 2018).
- Feng, Z. *et al.* (2007) 'The VP35 Protein of Ebola Virus Inhibits the Antiviral Effect Mediated by Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR', *Journal of Virology*, 81(1), pp. 182–192. doi: 10.1128/JVI.01006-06.
- Fowler, T. *et al.* (2005) 'Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference', *Journal of General Virology*, 86(4), pp. 1181–1188. doi: 10.1099/vir.0.80622-0.
- Funke, C. *et al.* (1995) 'Acylation of the Marburg virus glycoprotein.', *Virology*, 208(1), pp. 289–97. doi: 10.1006/viro.1995.1151.
- Gear, J. S. *et al.* (1975) 'Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg.', *British medical journal*, 4(5995), pp. 489–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/811315> (Accessed: 15 March 2018).
- Geisbert, T. W. *et al.* (2003) 'Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques', *The American Journal of Pathology*, 163(6), pp. 2347–2370. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63591-2.
- Geisbert, T. W. *et al.* (2006) 'Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference.', *The Journal of infectious diseases*, 193(12), pp. 1650–7. doi: 10.1086/504267.
- Geisbert, T. W. *et al.* (2010) 'Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study', *The Lancet*, 375(9729), pp. 1896–1905. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60357-1.
- Gerszten, R. E. *et al.* (1999) 'MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions', *Nature*, 398(6729), pp. 718–723. doi: 10.1038/19546.
- Geyer, H. *et al.* (1992) 'Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein.', *Glycobiology*, 2(4), pp. 299–312. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1421752> (Accessed: 21 March 2018).
- Giese, S. *et al.* (2017) 'Role of influenza A virus NP acetylation on viral growth and replication.', *Nature communications*, 8(1), p. 1259. doi: 10.1038/s41467-017-01112-3.
- Gomis-Rüth, F. X. *et al.* (2003) 'The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties.', *Structure (London, England : 1993)*, 11(4), pp. 423–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12679020> (Accessed: 21 March 2018).
- Gramberg, T. *et al.* (2005) 'LSECTin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus.', *Virology*, 340(2), pp. 224–36. doi: 10.1016/j.virol.2005.06.026.
- Groseth, A. *et al.* (2009) 'The Ebola virus ribonucleoprotein complex: A novel VP30–L interaction identified', *Virus Research*, 140(1–2), pp. 8–14. doi: 10.1016/j.virusres.2008.10.017.
- Gsell, P.-S. *et al.* (2017) 'Ring vaccination with rVSV-ZEBOV under expanded access in

response to an outbreak of Ebola virus disease in Guinea, 2016: an operational and vaccine safety report', *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), pp. 1276–1284. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30541-8.

Le Guenno, B. *et al.* (1995) 'Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus.', *Lancet (London, England)*, 345(8960), pp. 1271–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7746057> (Accessed: 17 December 2017).

Guo, J. *et al.* (2017) 'Protein Inhibitor of Activated STAT2 Restricts HCV Replication by Modulating Viral Proteins Degradation', *Viruses*, 9(10), p. 285. doi: 10.3390/v9100285.

Han, Q. *et al.* (2014) 'Sumoylation of Influenza A Virus Nucleoprotein Is Essential for Intracellular Trafficking and Virus Growth', *Journal of Virology*, 88(16), pp. 9379–9390. doi: 10.1128/JVI.00509-14.

Hartlieb, B. *et al.* (2003) 'Oligomerization of Ebola Virus VP30 Is Essential for Viral Transcription and Can Be Inhibited by a Synthetic Peptide', *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), pp. 41830–41836. doi: 10.1074/jbc.M307036200.

Hartlieb, B. *et al.* (2007) 'Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2), pp. 624–629. doi: 10.1073/pnas.0606730104.

Hartman, A. L., Towner, J. S. and Nichol, S. T. (2004) 'A C-terminal basic amino acid motif of Zaire ebolavirus VP35 is essential for type I interferon antagonism and displays high identity with the RNA-binding domain of another interferon antagonist, the NS1 protein of influenza A virus', *Virology*, 328(2), pp. 177–184. doi: 10.1016/j.virol.2004.07.006.

Henao-Restrepo, A. M. *et al.* (2017) 'Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!)', *The Lancet*, 389(10068), pp. 505–518. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32621-6.

Herz, H.-M., Garruss, A. and Shilatifard, A. (2013) 'SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins', *Trends in Biochemical Sciences*, 38(12), pp. 621–639. doi: 10.1016/j.tibs.2013.09.004.

Hoenen, T. *et al.* (2005) 'VP40 Octamers Are Essential for Ebola Virus Replication', *Journal of Virology*, 79(3), pp. 1898–1905. doi: 10.1128/JVI.79.3.1898-1905.2005.

Hoenen, T. *et al.* (2006) 'Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease.', *Trends in molecular medicine*, 12(5), pp. 206–15. doi: 10.1016/j.molmed.2006.03.006.

Hoenen, T. *et al.* (2006) 'Infection of Naive Target Cells with Virus-Like Particles: Implications for the Function of Ebola Virus VP24', *Journal of Virology*, 80(14), pp. 7260–7264. doi: 10.1128/JVI.00051-06.

Hoenen, T. *et al.* (2011) 'Minigenomes, transcription and replication competent virus-like particles and beyond: Reverse genetics systems for filoviruses and other negative stranded hemorrhagic fever viruses', *Antiviral Research*, 91(2), pp. 195–208. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.06.003.

Hoenen, T. *et al.* (2012) 'Inclusion Bodies Are a Site of Ebolavirus Replication', *Journal of Virology*, 86(21), pp. 11779–11788. doi: 10.1128/JVI.01525-12.

Hou, X. *et al.* (2017) 'SUMOylation represses the transcriptional activity of the Unfolded Protein Response transducer ATF6', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(3–4), pp. 446–451. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.103.

Huttlin, E. L. *et al.* (2015) 'The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome', *Cell*, 162(2), pp. 425–440. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.043.

- Ichimura, T. *et al.* (2005) 'Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(14), pp. 13928–35. doi: 10.1074/jbc.M413654200.
- Iversen, P. *et al.* (2012) 'Discovery and Early Development of AVI-7537 and AVI-7288 for the Treatment of Ebola Virus and Marburg Virus Infections', *Viruses*, 4(11), pp. 2806–2830. doi: 10.3390/v4112806.
- Jackson, P. K. (2001) 'A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases', *Genes & Development*, 15(23), pp. 3053–3058. doi: 10.1101/gad.955501.
- Jahrling, P. B. *et al.* (1990) 'Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA.', *Lancet (London, England)*, 335(8688), pp. 502–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1968529> (Accessed: 17 December 2017).
- John, S. P. *et al.* (2007) 'Ebola virus VP30 is an RNA binding protein.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 81(17), pp. 8967–76. doi: 10.1128/JVI.02523-06.
- Johnson, E. D. *et al.* (1996) 'Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya.', *Archives of virology. Supplementum*, 11, pp. 101–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8800792> (Accessed: 17 December 2017).
- Johnson, E. S. and Gupta, A. A. (2001) 'An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins.', *Cell*, 106(6), pp. 735–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572779> (Accessed: 19 December 2017).
- Johnson, K. . *et al.* (1977) 'Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire.', *The Lancet*. Elsevier, 309(8011), pp. 569–571. doi: 10.1016/S0140-6736(77)92000-1.
- Jones, S. M. *et al.* (2005) 'Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses', *Nature Medicine*, 11(7), pp. 786–790. doi: 10.1038/nm1258.
- Jouvenet, N. *et al.* (2009) 'Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin.', *Journal of virology*, 83(4), pp. 1837–44. doi: 10.1128/JVI.02211-08.
- Kahyo, T., Nishida, T. and Yasuda, H. (2001) 'Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53.', *Molecular cell*, 8(3), pp. 713–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583632> (Accessed: 19 December 2017).
- Karanth, A. V. *et al.* (2017) 'Emerging role of SETDB1 as a therapeutic target', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(3), pp. 319–331. doi: 10.1080/14728222.2017.1279604.
- Kaushik, A. *et al.* (2016) 'Towards detection and diagnosis of Ebola virus disease at point-of-care', *Biosensors and Bioelectronics*, 75, pp. 254–272. doi: 10.1016/j.bios.2015.08.040.
- Kerber, R. *et al.* (2016) 'Analysis of Diagnostic Findings From the European Mobile Laboratory in Guéckédou, Guinea, March 2014 Through March 2015', *Journal of Infectious Diseases*, 214(suppl 3), pp. S250–S257. doi: 10.1093/infdis/jiw269.
- Kiley, M. P. *et al.* (1982) 'Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses?', *Intervirology*, 18(1–2), pp. 24–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7118520> (Accessed: 14 December 2017).
- Kiley, M. P. *et al.* (1986) 'Conservation of the 3' terminal nucleotide sequences of Ebola and Marburg virus.', *Virology*, 149(2), pp. 251–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3946083> (Accessed: 16 April 2018).
- Kim, E. T. *et al.* (2014) 'Analysis of Human Cytomegalovirus-Encoded SUMO Targets and

Temporal Regulation of SUMOylation of the Immediate-Early Proteins IE1 and IE2 during Infection', *PLoS ONE*. Edited by J. Spencer, 9(7), p. e103308. doi: 10.1371/journal.pone.0103308.

Kipp, M. *et al.* (2000) 'SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA.', *Molecular and cellular biology*, 20(20), pp. 7480–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11003645> (Accessed: 22 November 2017).

Kirchdoerfer, R. N. *et al.* (2016) 'The Ebola Virus VP30-NP Interaction Is a Regulator of Viral RNA Synthesis', *PLoS Pathogens*. Edited by M. J. Schnell, 12(10), p. e1005937. doi: 10.1371/journal.ppat.1005937.

Koellhoffer, J. F. *et al.* (2012) 'Crystal Structure of the Marburg Virus GP2 Core Domain in Its Postfusion Conformation', *Biochemistry*, 51(39), pp. 7665–7675. doi: 10.1021/bi300976m.

Kolesnikova, L. *et al.* (2000) 'Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions.', *Journal of virology*, 74(8), pp. 3899–904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729166> (Accessed: 20 March 2018).

Kolesnikova, L. *et al.* (2002) 'VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment.', *Journal of virology*, 76(4), pp. 1825–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11799178> (Accessed: 21 March 2018).

Kolesnikova, L. *et al.* (2004) 'The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway.', *Journal of virology*, 78(5), pp. 2382–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963134> (Accessed: 21 March 2018).

Kolesnikova, L. *et al.* (2007) 'Budding of Marburgvirus is associated with filopodia', *Cellular Microbiology*, 9(4), pp. 939–951. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00842.x.

Kolesnikova, L. *et al.* (2009) 'Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus.', *Journal of virology*, 83(5), pp. 2327–37. doi: 10.1128/JVI.02184-08.

Kolesnikova, L. *et al.* (2012) 'Phosphorylation of Marburg virus matrix protein VP40 triggers assembly of nucleocapsids with the viral envelope at the plasma membrane', *Cellular Microbiology*, 14(2), pp. 182–197. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01709.x.

Kondratowicz, A. S. *et al.* (2011) 'T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), pp. 8426–8431. doi: 10.1073/pnas.1019030108.

Kortepeter, M. G., Bausch, D. G. and Bray, M. (2011) 'Basic Clinical and Laboratory Features of Filoviral Hemorrhagic Fever', *The Journal of Infectious Diseases*, 204(suppl_3), pp. S810–S816. doi: 10.1093/infdis/jir299.

Kotaja, N. *et al.* (2002) 'PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases.', *Molecular and cellular biology*, 22(14), pp. 5222–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077349> (Accessed: 19 December 2017).

Kotecki, M., Reddy, P. S. and Cochran, B. H. (1999) 'Isolation and Characterization of a Near-Haploid Human Cell Line', *Experimental Cell Research*, 252(2), pp. 273–280. doi: 10.1006/excr.1999.4656.

Krähling, V. *et al.* (2016) 'Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus', *Medical Microbiology and Immunology*, 205(2), pp. 173–183. doi: 10.1007/s00430-015-0438-6.

Kruse, T. *et al.* (2018) 'The Ebola Virus Nucleoprotein Recruits the Host PP2A-B56 Phosphatase to Activate Transcriptional Support Activity of VP30', *Molecular Cell*, 69(1), p.

136–145.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.11.034.

Kubota, T. *et al.* (2008) 'Virus Infection Triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, Leading to the Negative Regulation of Type I Interferon Gene Expression', *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), pp. 25660–25670. doi: 10.1074/jbc.M804479200.

Kuhn, J. H. (2008) 'Filoviruses. A compendium of 40 years of epidemiological, clinical, and laboratory studies.', *Archives of virology. Supplementum*, 20, pp. 13–360. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637412> (Accessed: 13 April 2018).

Kuhn, J. H. *et al.* (2010) 'Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations', *Archives of Virology*, 155(12), pp. 2083–2103. doi: 10.1007/s00705-010-0814-x.

Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.

Ledsaak, M. *et al.* (2016) 'PIAS1 binds p300 and behaves as a coactivator or corepressor of the transcription factor c-Myb dependent on SUMO-status', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(5), pp. 705–718. doi: 10.1016/j.bbagrm.2016.03.011.

Lee, B.-H. *et al.* (2003) 'Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules.', *Virus research*, 98(1), pp. 83–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609633> (Accessed: 21 November 2017).

Lee, J.-M. *et al.* (2003) 'PIAS1 enhances SUMO-1 modification and the transactivation activity of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus.', *FEBS letters*, 555(2), pp. 322–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644436> (Accessed: 22 January 2018).

Lee, P. S. W. *et al.* (2003) 'Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(30), pp. 27853–63. doi: 10.1074/jbc.M301755200.

Léger, K. *et al.* (2014) 'ARTD2 activity is stimulated by RNA', *Nucleic Acids Research*, 42(8), pp. 5072–5082. doi: 10.1093/nar/gku131.

Leroy, E. M. *et al.* (2005) 'Fruit bats as reservoirs of Ebola virus', *Nature*, 438(7068), pp. 575–576. doi: 10.1038/438575a.

Leung, D. W. *et al.* (2009) 'Structure of the Ebola VP35 interferon inhibitory domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), pp. 411–416. doi: 10.1073/pnas.0807854106.

Li, J. *et al.* (2010) 'Inhibition of STAT1 methylation is involved in the resistance of hepatitis B virus to Interferon alpha', *Antiviral Research*, 85(3), pp. 463–469. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.011.

Li, L. *et al.* (2007) 'PACT is a negative regulator of p53 and essential for cell growth and embryonic development', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), pp. 7951–7956. doi: 10.1073/pnas.0701916104.

Li, X. *et al.* (2013) 'Ubiquitylation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I by HECTD1 regulates focal adhesion dynamics and cell migration', *Journal of Cell Science*, 126(12), pp. 2617–2628. doi: 10.1242/jcs.117044.

Liang, M. *et al.* (2004) 'Regulation of Smad4 sumoylation and transforming growth factor-beta signaling by protein inhibitor of activated STAT1.', *The Journal of biological chemistry*.

American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(22), pp. 22857–65. doi: 10.1074/jbc.M401554200.

Liao, J., Fu, Y. and Shuai, K. (2000) 'Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp. 5267–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805787> (Accessed: 22 November 2017).

Licata, J. M. *et al.* (2004) 'Contribution of Ebola Virus Glycoprotein, Nucleoprotein, and VP24 to Budding of VP40 Virus-Like Particles', *Journal of Virology*, 78(14), pp. 7344–7351. doi: 10.1128/JVI.78.14.7344-7351.2004.

Lier, C., Becker, S. and Biedenkopf, N. (2017) 'Dynamic phosphorylation of Ebola virus VP30 in NP-induced inclusion bodies', *Virology*, 512, pp. 39–47. doi: 10.1016/j.virol.2017.09.006.

Liu, B. *et al.* (1998) 'Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), pp. 10626–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724754> (Accessed: 22 November 2017).

Liu, B. *et al.* (2001) 'A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), pp. 3203–3207. doi: 10.1073/pnas.051489598.

Liu, B. *et al.* (2004) 'PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity', *Nature Immunology*, 5(9), pp. 891–898. doi: 10.1038/ni1104.

Liu, B. *et al.* (2005) 'Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1.', *Molecular and cellular biology*, 25(3), pp. 1113–23. doi: 10.1128/MCB.25.3.1113-1123.2005.

Liu, S.-T. *et al.* (2006) 'Sumoylation of Rta of Epstein–Barr virus is preferentially enhanced by PIASxβ', *Virus Research*, 119(2), pp. 163–170. doi: 10.1016/j.virusres.2006.01.004.

Liu, Y. *et al.* (2012) 'NF-κB Repression by PIAS3 Mediated RelA SUMOylation', *PLoS ONE*. Edited by E. Harhaj, 7(5), p. e37636. doi: 10.1371/journal.pone.0037636.

Long, J. *et al.* (2004) 'Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3)', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), pp. 99–104. doi: 10.1073/pnas.0307598100.

Lötfering, B. *et al.* (1999) 'The Nucleoprotein of Marburg Virus Is Target for Multiple Cellular Kinases', *Virology*, 255(1), pp. 50–62. doi: 10.1006/viro.1998.9577.

Lowrey, A. J., Cramblet, W. and Bentz, G. L. (2017) 'Viral manipulation of the cellular sumoylation machinery', *Cell Communication and Signaling*, 15(1), p. 27. doi: 10.1186/s12964-017-0183-0.

Lu, J. *et al.* (2013) 'Host IQGAP1 and Ebola Virus VP40 Interactions Facilitate Virus-Like Particle Egress', *Journal of Virology*, 87(13), pp. 7777–7780. doi: 10.1128/JVI.00470-13.

Lubaki, N. M. *et al.* (2013) 'The Lack of Maturation of Ebola Virus-Infected Dendritic Cells Results from the Cooperative Effect of at Least Two Viral Domains', *Journal of Virology*, 87(13), pp. 7471–7485. doi: 10.1128/JVI.03316-12.

Lubaki, N. M. *et al.* (2016) 'The Ebola Interferon Inhibiting Domains Attenuate and Dysregulate Cell-Mediated Immune Responses', *PLOS Pathogens*. Edited by P. G. Thomas, 12(12), p. e1006031. doi: 10.1371/journal.ppat.1006031.

Luthra, P. *et al.* (2013) 'Mutual Antagonism between the Ebola Virus VP35 Protein and the RIG-I Activator PACT Determines Infection Outcome', *Cell Host & Microbe*, 14(1), pp. 74–84. doi: 10.1016/j.chom.2013.06.010.

- MacNeil, A. *et al.* (2011) 'Filovirus Outbreak Detection and Surveillance: Lessons From Bundibugyo', *Journal of Infectious Diseases*, 204(suppl 3), pp. S761–S767. doi: 10.1093/infdis/jir294.
- Mahajan, R. *et al.* (1997) 'A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2.', *Cell*, 88(1), pp. 97–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9019411> (Accessed: 15 February 2018).
- Mahanty, S. *et al.* (2003) 'Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(6), pp. 2797–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626527> (Accessed: 17 April 2018).
- Martinez, M. J. *et al.* (2011) 'Role of VP30 Phosphorylation in the Ebola Virus Replication Cycle', *The Journal of Infectious Diseases*, 204(suppl_3), pp. S934–S940. doi: 10.1093/infdis/jir320.
- Martínez, M. J. *et al.* (2008) 'Role of Ebola virus VP30 in transcription reinitiation.', *Journal of virology*, 82(24), pp. 12569–73. doi: 10.1128/JVI.01395-08.
- Martini, G. A. *et al.* (1968) 'A hitherto unknown infectious disease contracted from monkeys. "Marburg-virus" disease.', *German medical monthly*, 13(10), pp. 457–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4974179> (Accessed: 16 December 2017).
- Martini, G. A. (1973) 'Marburg virus disease.', *Postgraduate medical journal*, 49(574), pp. 542–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4207635> (Accessed: 16 December 2017).
- Martini, G. A. and Schmidt, H. A. (1968) '[Spermatogenic transmission of the "Marburg virus": (Causes of "Marburg simian disease")].', *Klinische Wochenschrift*, 46(7), pp. 398–400. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4971902> (Accessed: 13 April 2018).
- Marzi, A. *et al.* (2007) 'Analysis of the Interaction of Ebola Virus Glycoprotein with DC-SIGN (Dendritic Cell–Specific Intercellular Adhesion Molecule 3–Grabbing Nonintegrin) and Its Homologue DC-SIGNR', *The Journal of Infectious Diseases*, 196(s2), pp. S237–S246. doi: 10.1086/520607.
- Mateo, M. *et al.* (2010) 'Ebola virus VP24 binding to karyopherins is required for inhibition of interferon signaling.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 84(2), pp. 1169–75. doi: 10.1128/JVI.01372-09.
- Matsui, T. *et al.* (2010) 'Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET', *Nature*, 464(7290), pp. 927–931. doi: 10.1038/nature08858.
- Matsuno, K. *et al.* (2010) 'Different Potential of C-Type Lectin-Mediated Entry between Marburg Virus Strains', *Journal of Virology*, 84(10), pp. 5140–5147. doi: 10.1128/JVI.02021-09.
- Mavrakis, M. *et al.* (2002) 'Morphology of Marburg Virus NP–RNA', *Virology*, 296(2), pp. 300–307. doi: 10.1006/viro.2002.1433.
- McCormick, J. B. *et al.* (1983) 'Biologic differences between strains of Ebola virus from Zaire and Sudan.', *The Journal of infectious diseases*, 147(2), pp. 264–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6827142> (Accessed: 17 March 2018).
- Megidish, T., Xu, J. H. and Xu, C. W. (2002) 'Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1).', *The Journal of biological chemistry*, 277(10), pp. 8255–9. doi: 10.1074/jbc.C200001200.
- Mehedi, M. *et al.* (2011) 'A New Ebola Virus Nonstructural Glycoprotein Expressed through

- RNA Editing', *Journal of Virology*, 85(11), pp. 5406–5414. doi: 10.1128/JVI.02190-10.
- Mehedi, M. *et al.* (2011) 'Clinical aspects of Marburg hemorrhagic fever', *Future Virology*, 6(9), pp. 1091–1106. doi: 10.2217/fvl.11.79.
- Messaoudi, I., Amarasinghe, G. K. and Basler, C. F. (2015) 'Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus', *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), pp. 663–676. doi: 10.1038/nrmicro3524.
- Minkovsky, A. *et al.* (2014) 'The Mbd1-Atf7ip-Setdb1 pathway contributes to the maintenance of X chromosome inactivation.', *Epigenetics & chromatin*, 7(1), p. 12. doi: 10.1186/1756-8935-7-12.
- Miotto, B. *et al.* (2014) 'The RBBP6/ZBTB38/MCM10 Axis Regulates DNA Replication and Common Fragile Site Stability', *Cell Reports*, 7(2), pp. 575–587. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.030.
- Misasi, J. *et al.* (2012) 'Filoviruses Require Endosomal Cysteine Proteases for Entry but Exhibit Distinct Protease Preferences', *Journal of Virology*, 86(6), pp. 3284–3292. doi: 10.1128/JVI.06346-11.
- Miyauchi, Y. *et al.* (2002) 'Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(51), pp. 50131–6. doi: 10.1074/jbc.M208319200.
- Modrof, J. *et al.* (2001) 'Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions.', *Virology*, 287(1), pp. 171–82. doi: 10.1006/viro.2001.1027.
- Modrof, J. *et al.* (2002) 'Phosphorylation of VP30 Impairs Ebola Virus Transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), pp. 33099–33104. doi: 10.1074/jbc.M203775200.
- Modrof, J., Becker, S. and Mühlberger, E. (2003) 'Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 77(5), pp. 3334–8. doi: 10.1128/JVI.77.5.3334-3338.2003.
- Mohan, G. S. *et al.* (2012) 'Antigenic Subversion: A Novel Mechanism of Host Immune Evasion by Ebola Virus', *PLoS Pathogens*. Edited by C. F. Basler, 8(12), p. e1003065. doi: 10.1371/journal.ppat.1003065.
- Möller, P. *et al.* (2005) 'Homo-Oligomerization of Marburgvirus VP35 Is Essential for Its Function in Replication and Transcription', *Journal of Virology*, 79(23), pp. 14876–14886. doi: 10.1128/JVI.79.23.14876–14886.2005.
- Mu, X. *et al.* (2013) 'YB-1 stabilizes HIV-1 genomic RNA and enhances viral production', *Protein & Cell*, 4(8), pp. 591–597. doi: 10.1007/s13238-013-3011-3.
- Mühlberger, E. *et al.* (1992) 'The nucleotide sequence of the L gene of marburg virus, a filovirus: Homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses', *Virology*, 187(2), pp. 534–547. doi: 10.1016/0042-6822(92)90456-Y.
- Mühlberger, E. *et al.* (1996) 'Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure.', *Virology*, 223(2), pp. 376–80. doi: 10.1006/viro.1996.0490.
- Mühlberger, E. *et al.* (1998) 'Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes.', *Journal of virology*, 72(11), pp. 8756–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9765419> (Accessed: 25 October 2017).
- Mühlberger, E. *et al.* (1999) 'Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems.', *Journal of virology*,

73(3), pp. 2333–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971816> (Accessed: 25 October 2017).

Mühlberger, E. (2007) 'Filovirus replication and transcription.', *Future virology*. NIH Public Access, 2(2), pp. 205–215. doi: 10.2217/17460794.2.2.205.

Nakayama, E. *et al.* (2010) 'Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies.', *Clinical and vaccine immunology: CVI*. American Society for Microbiology (ASM), 17(11), pp. 1723–8. doi: 10.1128/CVI.00170-10.

Nanbo, A. *et al.* (2010) 'Ebola virus Is Internalized into Host Cells via Macropinocytosis in a Viral Glycoprotein-Dependent Manner', *PLoS Pathogens*. Edited by F. A. Rey, 6(9), p. e1001121. doi: 10.1371/journal.ppat.1001121.

Negredo, A. *et al.* (2011) 'Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe.', *PLoS pathogens*. Edited by C. F. Basler, 7(10), p. e1002304. doi: 10.1371/journal.ppat.1002304.

Neil, S. J. D. *et al.* (2007) 'An Interferon- α -Induced Tethering Mechanism Inhibits HIV-1 and Ebola Virus Particle Release but Is Counteracted by the HIV-1 Vpu Protein', *Cell Host & Microbe*, 2(3), pp. 193–203. doi: 10.1016/j.chom.2007.08.001.

Nikiforov, V. V. *et al.* (1994) 'A case of a laboratory infection with Marburg fever', *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 3(3), pp. 104–106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7941853> (Accessed: 13 April 2018).

Nishitsuji, H. *et al.* (2015) 'ZNF10 inhibits HIV-1 LTR activity through interaction with NF- κ B and Sp1 binding motifs', *FEBS Letters*, 589(15), pp. 2019–2025. doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.013.

Noda, T. *et al.* (2002) 'Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 76(10), pp. 4855–65. doi: 10.1128/JVI.76.10.4855-4865.2002.

Noh, H.-J., Kim, K.-A. and Kim, K.-C. (2014) 'p53 down-regulates SETDB1 gene expression during paclitaxel induced-cell death.', *Biochemical and biophysical research communications*, 446(1), pp. 43–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.053.

Ogawa, H. *et al.* (2002) 'A Complex with Chromatin Modifiers That Occupies E2F- and Myc-Responsive Genes in G0 Cells', *Science*, 296(5570), pp. 1132–1136. doi: 10.1126/science.1069861.

Ogawa, H. *et al.* (2011) 'Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene', *Journal of Virological Methods*, 171(1), pp. 310–313. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.11.010.

Ohshima, T. and Shimotohno, K. (2003) 'Transforming Growth Factor- β -mediated Signaling via the p38 MAP Kinase Pathway Activates Smad-dependent Transcription through SUMO-1 Modification of Smad4', *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), pp. 50833–50842. doi: 10.1074/jbc.M307533200.

Paulson, M. *et al.* (2002) 'IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff', *Nature Cell Biology*, 4(2), pp. 140–147. doi: 10.1038/ncb747.

Pichlmair, A. *et al.* (2011) 'IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA', *Nature Immunology*, 12(7), pp. 624–630. doi: 10.1038/ni.2048.

Pigott, D. M. *et al.* (2014) 'Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa', *eLife*, 3, p. e04395. doi: 10.7554/eLife.04395.

Pigott, D. M. *et al.* (2015) 'Mapping the zoonotic niche of Marburg virus disease in Africa', *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(6), pp. 366–378.

doi: 10.1093/trstmh/trv024.

Poch, O. *et al.* (1990) 'Sequence Comparison of Five Polymerases (L proteins) of Unsegmented Negative-strand RNA Viruses: Theoretical Assignment of Functional Domains', *Journal of General Virology*, 71(5), pp. 1153–1162. doi: 10.1099/0022-1317-71-5-1153.

PREVAIL II Writing Group *et al.* (2016) 'A Randomized, Controlled Trial of ZMapp for Ebola Virus Infection', *New England Journal of Medicine*, 375(15), pp. 1448–1456. doi: 10.1056/NEJMoa1604330.

Prins, K. C., Cardenas, W. B. and Basler, C. F. (2009) 'Ebola Virus Protein VP35 Impairs the Function of Interferon Regulatory Factor-Activating Kinases IKK and TBK-1', *Journal of Virology*, 83(7), pp. 3069–3077. doi: 10.1128/JVI.01875-08.

Pugh, D. *et al.* (2006) 'DWN, a novel ubiquitin-like domain, implicates RBBP6 in mRNA processing and ubiquitin-like pathways.', *BMC Structural Biology*, 6(1), p. 1. doi: 10.1186/1472-6807-6-1.

Qiu, X. *et al.* (2014) 'Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp', *Nature*. Nature Publishing Group, 514(7520), pp. 47–53. doi: 10.1038/nature13777.

Ramanan, P. *et al.* (2012) 'Structural basis for Marburg virus VP35-mediated immune evasion mechanisms.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(50), pp. 20661–6. doi: 10.1073/pnas.1213559109.

Rauwel, B. *et al.* (2015) 'Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch', *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.06068.

Reid, S. P. *et al.* (2006) 'Ebola Virus VP24 Binds Karyopherin 1 and Blocks STAT1 Nuclear Accumulation', *Journal of Virology*, 80(11), pp. 5156–5167. doi: 10.1128/JVI.02349-05.

Reid, S. P. *et al.* (2007) 'Ebola Virus VP24 Proteins Inhibit the Interaction of NPI-1 Subfamily Karyopherin Proteins with Activated STAT1', *Journal of Virology*, 81(24), pp. 13469–13477. doi: 10.1128/JVI.01097-07.

Reynolds, P. and Marzi, A. (2017) 'Ebola and Marburg virus vaccines', *Virus Genes*, 53(4), pp. 501–515. doi: 10.1007/s11262-017-1455-x.

Richman, D. D. *et al.* (1983) 'Antigenic analysis of strains of Ebola virus: identification of two Ebola virus serotypes.', *The Journal of infectious diseases*, 147(2), pp. 268–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6827143> (Accessed: 16 December 2017).

Robbez-Masson, L., Tie, C. H. C. and Rowe, H. M. (2017) 'Cancer cells, on your histone marks, get SETDB1, silence retrotransposons, and go!', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 216(11), pp. 3429–3431. doi: 10.1083/jcb.201710068.

Roddy, P. *et al.* (2012) 'Clinical Manifestations and Case Management of Ebola Haemorrhagic Fever Caused by a Newly Identified Virus Strain, Bundibugyo, Uganda, 2007–2008', *PLoS ONE*. Edited by M. G. Semple. Public Library of Science, 7(12), p. e52986. doi: 10.1371/journal.pone.0052986.

Rogers, R. S., Horvath, C. M. and Matunis, M. J. (2003) 'SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(32), pp. 30091–7. doi: 10.1074/jbc.M301344200.

Rosas-Acosta, G. *et al.* (2005) 'Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein', *Virology*, 331(1), pp. 190–203. doi: 10.1016/j.virol.2004.10.025.

- Rougeron, V. *et al.* (2015) 'Ebola and Marburg haemorrhagic fever', *Journal of Clinical Virology*. Elsevier, 64, pp. 111–119. doi: 10.1016/J.JCV.2015.01.014.
- Rowe, A. K. *et al.* (1999) 'Clinical, Virologic, and Immunologic Follow-Up of Convalescent Ebola Hemorrhagic Fever Patients and Their Household Contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo', *The Journal of Infectious Diseases*, 179(s1), pp. S28–S35. doi: 10.1086/514318.
- Rowe, H. M. *et al.* (2010) 'KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells', *Nature*, 463(7278), pp. 237–240. doi: 10.1038/nature08674.
- Saeed, M. F. *et al.* (2010) 'Cellular Entry of Ebola Virus Involves Uptake by a Macropinocytosis-Like Mechanism and Subsequent Trafficking through Early and Late Endosomes', *PLoS Pathogens*. Edited by C. F. Basler, 6(9), p. e1001110. doi: 10.1371/journal.ppat.1001110.
- Sakai, Y. *et al.* (1995) 'cDNA sequence and chromosomal localization of a novel human protein, RBQ-1 (RBBP6), that binds to the retinoblastoma gene product', *Genomics*, 30(1), pp. 98–101. doi: 10.1006/geno.1995.0017.
- Sanchez, A. *et al.* (1996) 'The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 93(8), pp. 3602–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622982> (Accessed: 21 March 2018).
- Sänger, C. *et al.* (2002) 'The Marburg Virus Surface Protein GP Is Phosphorylated at Its Ectodomain', *Virology*, 295(1), pp. 20–29. doi: 10.1006/viro.2002.1374.
- Schlereth, J. *et al.* (2016) 'RNA binding specificity of Ebola virus transcription factor VP30', *RNA Biology*, 13(9), pp. 783–798. doi: 10.1080/15476286.2016.1194160.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2002) 'Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), pp. 2872–2877. doi: 10.1073/pnas.052559499.
- Schmidt, D. and Müller, S. (2003) 'PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation.', *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(12), pp. 2561–74. doi: 10.1007/s00018-003-3129-1.
- Schmidt, K. M. and Mühlberger, E. (2016) 'Marburg virus reverse genetics systems', *Viruses*, p. 178. doi: 10.3390/v8060178.
- Schmidt, M. L. and Hoenen, T. (2017) 'Characterization of the catalytic center of the Ebola virus L polymerase', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by T. Geisbert, 11(10), p. e0005996. doi: 10.1371/journal.pntd.0005996.
- Schnittler, H. J. and Feldmann, H. (1998) 'Marburg and Ebola hemorrhagic fevers: does the primary course of infection depend on the accessibility of organ-specific macrophages?', *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27(2), pp. 404–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709901> (Accessed: 18 March 2018).
- Schudt, G. *et al.* (2013) 'Live-cell imaging of Marburg virus-infected cells uncovers actin-dependent transport of nucleocapsids over long distances', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), pp. 14402–14407. doi: 10.1073/pnas.1307681110.
- Schudt, G. *et al.* (2015) 'Transport of Ebolavirus Nucleocapsids Is Dependent on Actin Polymerization: Live-Cell Imaging Analysis of Ebolavirus-Infected Cells', *Journal of Infectious Diseases*, 212(suppl 2), pp. S160–S166. doi: 10.1093/infdis/jiv083.

- Schultz, D. C. *et al.* (2002) 'SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins', *Genes & Development*, 16(8), pp. 919–932. doi: 10.1101/gad.973302.
- Schumann, M., Gantke, T. and Muhlberger, E. (2009) 'Ebola Virus VP35 Antagonizes PKR Activity through Its C-Terminal Interferon Inhibitory Domain', *Journal of Virology*, 83(17), pp. 8993–8997. doi: 10.1128/JVI.00523-09.
- Shen, X. *et al.* (2017) 'HECTD1 controls the protein level of IQGAP1 to regulate the dynamics of adhesive structures', *Cell Communication and Signaling*, 15(1), p. 2. doi: 10.1186/s12964-016-0156-8.
- Shimajima, M. *et al.* (2006) 'Tyro3 Family-Mediated Cell Entry of Ebola and Marburg Viruses', *Journal of Virology*, 80(20), pp. 10109–10116. doi: 10.1128/JVI.01157-06.
- Shuai, K. and Liu, B. (2005) 'Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system.', *Nature reviews. Immunology*, 5(8), pp. 593–605. doi: 10.1038/nri1667.
- Siebert, R. *et al.* (1968) 'The aetiology of an unknown human infection transmitted by monkeys (preliminary communication).', *German medical monthly*, 13(1), pp. 1–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4968593> (Accessed: 15 March 2018).
- Siebert, R., Shu, H.-L. and Slenczka, W. (1968) 'Isolierung und Identifizierung des „Marburg-Virus“', *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 93(12), pp. 604–612. doi: 10.1055/s-0028-1105103.
- Sievers, F. *et al.* (2011) 'Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.', *Molecular systems biology*, 7(1), p. 539. doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Simons, A. *et al.* (1997) 'PACT: cloning and characterization of a cellular p53 binding protein that interacts with Rb', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 14(2), pp. 145–155. doi: 10.1038/sj.onc.1200825.
- Sissoko, D. *et al.* (2016) 'Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea', *PLOS Medicine*. Edited by M. Lipsitch. Public Library of Science, 13(3), p. e1001967. doi: 10.1371/journal.pmed.1001967.
- Slenczka, W. *et al.* (1968) 'Antigen-Nachweis des „Marburg-Virus“ in den Organen infizierter Meerschweinchen durch Immunfluoreszenz', *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 93(12), pp. 612–616. doi: 10.1055/s-0028-1105104.
- Slenczka, W. and Klenk, H. D. (2007) 'Forty Years of Marburg Virus', *The Journal of Infectious Diseases*, 196(s2), pp. S131–S135. doi: 10.1086/520551.
- Smith, D. H. *et al.* (1982) 'Marburg-virus disease in Kenya.', *Lancet (London, England)*, 1(8276), pp. 816–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6122054> (Accessed: 18 March 2018).
- Sripathy, S. P., Stevens, J. and Schultz, D. C. (2006) 'The KAP1 Corepressor Functions To Coordinate the Assembly of De Novo HP1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for KRAB Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression', *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), pp. 8623–8638. doi: 10.1128/MCB.00487-06.
- Stanley, D. A. *et al.* (2014) 'Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge', *Nature Medicine*, 20(10), pp. 1126–1129. doi: 10.1038/nm.3702.
- Stärkel, P. *et al.* (2007) 'Role of signal transducer and activator of transcription 3 in liver

- fibrosis progression in chronic hepatitis C-infected patients', *Laboratory Investigation*, 87(2), pp. 173–181. doi: 10.1038/labinvest.3700496.
- Sterk, E. (2008) 'Filovirus Haemorrhagic Fever Guideline - Médecins Sans Frontières', *Guideline*.
- Strecker, T. *et al.* (2015) 'Field Evaluation of Capillary Blood Samples as a Collection Specimen for the Rapid Diagnosis of Ebola Virus Infection During an Outbreak Emergency', *Clinical Infectious Diseases*, 61(5), pp. 669–675. doi: 10.1093/cid/civ397.
- Stroher, U. *et al.* (2001) 'Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses', *Journal of Virology*, 75(22), pp. 11025–11033. doi: 10.1128/JVI.75.22.11025-11033.2001.
- Swenson, D. L. *et al.* (2004) 'Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein.', *FEMS immunology and medical microbiology*, 40(1), pp. 27–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734183> (Accessed: 21 March 2018).
- Tachibana, K. *et al.* (2015) 'Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(4), pp. 725–731. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.065.
- Tachibana, M. *et al.* (2002) 'G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis', *Genes & Development*, 16(14), pp. 1779–1791. doi: 10.1101/gad.989402.
- Takahashi, K. *et al.* (2013) 'DNA Topoisomerase 1 Facilitates the Transcription and Replication of the Ebola Virus Genome', *Journal of Virology*, 87(16), pp. 8862–8869. doi: 10.1128/JVI.03544-12.
- Takamatsu, Y., Kolesnikova, L. and Becker, S. (2018) 'Ebola virus proteins NP, VP35, and VP24 are essential and sufficient to mediate nucleocapsid transport.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(5), pp. 1075–1080. doi: 10.1073/pnas.1712263115.
- Tapia, M. D. *et al.* (2016) 'Use of ChAd3-EB0-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-bli', *The Lancet Infectious Diseases*, 16(1), pp. 31–42. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00362-X.
- Timen, A. *et al.* (2009) 'Response to imported case of Marburg hemorrhagic fever, the Netherlands.', *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 15(8), pp. 1171–5. doi: 10.3201/eid1508.090015.
- Timmins, J. *et al.* (2003) 'Oligomerization and polymerization of the filovirus matrix protein VP40.', *Virology*, 312(2), pp. 359–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919741> (Accessed: 21 March 2018).
- Towner, J. S. *et al.* (2006) 'Marburgvirus Genomics and Association with a Large Hemorrhagic Fever Outbreak in Angola', *Journal of Virology*, 80(13), pp. 6497–6516. doi: 10.1128/JVI.00069-06.
- Towner, J. S. *et al.* (2007) 'Marburg Virus Infection Detected in a Common African Bat', *PLoS ONE*. Edited by P. Stevenson, 2(8), p. e764. doi: 10.1371/journal.pone.0000764.
- Towner, J. S. *et al.* (2008) 'Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda', *PLoS Pathogens*. Edited by C. F. Basler, 4(11), p. e1000212. doi: 10.1371/journal.ppat.1000212.

- Towner, J. S. *et al.* (2009) 'Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats', *PLoS Pathogens*. Edited by R. A. M. Fouchier, 5(7), p. e1000536. doi: 10.1371/journal.ppat.1000536.
- Trunschke, M. *et al.* (2013) 'The L–VP35 and L–L interaction domains reside in the amino terminus of the Ebola virus L protein and are potential targets for antivirals', *Virology*, 441(2), pp. 135–145. doi: 10.1016/j.virol.2013.03.013.
- Tussié-Luna, M. I. *et al.* (2002) 'Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASx β .', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 99(20), pp. 12807–12. doi: 10.1073/pnas.192464499.
- Ungureanu, D. *et al.* (2003) 'PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1.', *Blood*, 102(9), pp. 3311–3. doi: 10.1182/blood-2002-12-3816.
- Urata, S. *et al.* (2007) 'Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP.', *Journal of virology*, 81(9), pp. 4895–9. doi: 10.1128/JVI.02829-06.
- Urata, S. and Yasuda, J. (2010) 'Regulation of Marburg virus (MARV) budding by Nedd4.1: a different WW domain of Nedd4.1 is critical for binding to MARV and Ebola virus VP40.', *The Journal of general virology*, 91(Pt 1), pp. 228–34. doi: 10.1099/vir.0.015495-0.
- Urbanowicz, R. A. *et al.* (2016) 'Human Adaptation of Ebola Virus during the West African Outbreak', *Cell*, 167(4), p. 1079–1087.e5. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.013.
- Uyeki, T. M. *et al.* (2016) 'Clinical Management of Ebola Virus Disease in the United States and Europe', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 374(7), pp. 636–646. doi: 10.1056/NEJMoa1504874.
- Valle-García, D. *et al.* (2016) 'ATRX binds to atypical chromatin domains at the 3' exons of zinc finger genes to preserve H3K9me3 enrichment', *Epigenetics*, 11(6), pp. 398–414. doi: 10.1080/15592294.2016.1169351.
- Valmas, C. *et al.* (2010) 'Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus.', *PLoS pathogens*. Edited by Y. Kawaoka, 6(1), p. e1000721. doi: 10.1371/journal.ppat.1000721.
- Valmas, C. and Basler, C. F. (2011) 'Marburg virus VP40 antagonizes interferon signaling in a species-specific manner.', *Journal of virology*, 85(9), pp. 4309–17. doi: 10.1128/JVI.02575-10.
- Varkey, J. B. *et al.* (2015) 'Persistence of Ebola Virus in Ocular Fluid during Convalescence', *New England Journal of Medicine*, 372(25), pp. 2423–2427. doi: 10.1056/NEJMoa1500306.
- Volchkov, V. E. *et al.* (1995) 'GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases.', *Virology*, 214(2), pp. 421–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8553543> (Accessed: 21 March 2018).
- Volchkov, V. E. *et al.* (1999) 'Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus.', *The Journal of general virology*, 80 (Pt 2)(2), pp. 355–62. doi: 10.1099/0022-1317-80-2-355.
- Volchkova, V. A. *et al.* (1998) 'The Nonstructural Small Glycoprotein sGP of Ebola Virus Is Secreted as an Antiparallel-Orientated Homodimer', *Virology*, 250(2), pp. 408–414. doi: 10.1006/viro.1998.9389.
- Wan, W. *et al.* (2017) 'Structure and assembly of the Ebola virus nucleocapsid', *Nature*, 551(7680), pp. 394–397. doi: 10.1038/nature24490.

- Wang, H. *et al.* (2003) 'mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression.', *Molecular cell*, 12(2), pp. 475–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14536086> (Accessed: 2 March 2018).
- Wang, H. *et al.* (2016) 'Hepatitis B virus surface protein-induced hPIAS1 transcription requires TAL1, E47, MYOG, NFI, and MAPK signal pathways', *Biological Chemistry*, 397(11), pp. 1173–1185. doi: 10.1515/hsz-2015-0290.
- Wang, J. *et al.* (2008) 'Protein interaction data set highlighted with human Ras-MAPK/PI3K signaling pathways.', *Journal of proteome research*, 7(9), pp. 3879–89. doi: 10.1021/pr8001645.
- Wang, R. *et al.* (2017) 'The conserved ancient role of chordate PIAS as a multilevel repressor of the NF-κB pathway', *Scientific Reports*, 7(1), p. 17063. doi: 10.1038/s41598-017-16624-7.
- Warren, T. K. *et al.* (2014) 'Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430', *Nature*, 508(7496), pp. 402–405. doi: 10.1038/nature13027.
- Warren, T. K. *et al.* (2016) 'Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys', *Nature*, 531(7594), pp. 381–385. doi: 10.1038/nature17180.
- Watanabe, S. *et al.* (2004) 'Production of novel ebola virus-like particles from cDNAs: an alternative to ebola virus generation by reverse genetics.', *Journal of virology*, 78(2), pp. 999–1005. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14694131> (Accessed: 24 April 2018).
- Wauquier, N. *et al.* (2010) 'Human Fatal Zaire Ebola Virus Infection Is Associated with an Aberrant Innate Immunity and with Massive Lymphocyte Apoptosis', *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by T. W. Geisbert, 4(10), p. e837. doi: 10.1371/journal.pntd.0000837.
- Weik, M. *et al.* (2002) 'Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 76(17), pp. 8532–9. doi: 10.1128/JVI.76.17.8532-8539.2002.
- Weissenhorn, W. *et al.* (1998) 'Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain.', *Molecular cell*, 2(5), pp. 605–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844633> (Accessed: 18 April 2018).
- Welsch, S. *et al.* (2010) 'Electron tomography reveals the steps in filovirus budding.', *PLoS pathogens*. Edited by F. A. Rey, 6(4), p. e1000875. doi: 10.1371/journal.ppat.1000875.
- Wenigenrath, J. *et al.* (2010) 'Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus', *Journal of General Virology*, 91(5), pp. 1325–1334. doi: 10.1099/vir.0.018226-0.
- WHO Ebola Response Team (2016) 'After Ebola in West Africa — Unpredictable Risks, Preventable Epidemics', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 375(6), pp. 587–596. doi: 10.1056/NEJMs1513109.
- WHO, W. H. O. (2017) *Uganda ends Marburg virus disease outbreak*, *WHO News release*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/uganda-marburg-virus-disease/en/>.
- Will, C. *et al.* (1993) 'Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein.', *Journal of virology*, 67(3), pp. 1203–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8437211> (Accessed: 21 March 2018).
- Wilson, V. G. (ed.) (2017) *SUMO Regulation of Cellular Processes*. Cham: Springer International Publishing (Advances in Experimental Medicine and Biology). doi: 10.1007/978-

3-319-50044-7.

Yaddanapudi, K. *et al.* (2006) 'Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(14), pp. 2519–30. doi: 10.1096/fj.06-6151com.

Yang, L. *et al.* (2002) 'Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 21(1), pp. 148–152. doi: 10.1038/sj.onc.1204998.

Yang, L. *et al.* (2003) 'An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B.', *The Biochemical journal*, 369(Pt 3), pp. 651–7. doi: 10.1042/BJ20020854.

Ye, L. *et al.* (2010) 'Upregulation of SOCS-3 and PIAS-3 Impairs IL-12-Mediated Interferon-Gamma Response in CD56+ T Cells in HCV-Infected Heroin Users', *PLoS ONE*. Edited by H. E. Gendelman, 5(3), p. e9602. doi: 10.1371/journal.pone.0009602.

Yen, B. *et al.* (2014) 'Molecular Basis for Ebolavirus VP35 Suppression of Human Dendritic Cell Maturation', *Journal of Virology*, 88(21), pp. 12500–12510. doi: 10.1128/JVI.02163-14.

Yen, B. C. and Basler, C. F. (2016) 'Effects of Filovirus Interferon Antagonists on Responses of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells to RNA Virus Infection', *Journal of Virology*. Edited by D. S. Lyles, 90(10), pp. 5108–5118. doi: 10.1128/JVI.00191-16.

Yueh, A. *et al.* (2006) 'Interaction of Moloney Murine Leukemia Virus Capsid with Ubc9 and PIASy Mediates SUMO-1 Addition Required Early in Infection', *Journal of Virology*, 80(1), pp. 342–352. doi: 10.1128/JVI.80.1.342-352.2006.

Zhang, K., Lv, D.-W. and Li, R. (2017) 'B Cell Receptor Activation and Chemical Induction Trigger Caspase-Mediated Cleavage of PIAS1 to Facilitate Epstein-Barr Virus Reactivation', *Cell Reports*, 21(12), pp. 3445–3457. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.071.

Zohn, I. E., Anderson, K. V. and Niswander, L. (2007) 'The Hectd1 ubiquitin ligase is required for development of the head mesenchyme and neural tube closure', *Developmental Biology*, 306(1), pp. 208–221. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.018.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Filoviren.	1
Abbildung 2: Geographische Lage von Marburg-Virus Ausbrüchen von 1967-2012 und Verbreitung des Nilflughundes (<i>Rousettus aegyptiacus</i>) in Afrika.	3
Abbildung 3: Geographische Lage von Ebola-Virus Ausbrüchen von 1976-August 2016.	4
Abbildung 4: MARV Partikelbau und Genomstruktur.	9
Abbildung 5: MARV und EBOV VP35 hemmen die Interferon Induktion, verändert nach (Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015).	11
Abbildung 6: EBOV VP24 und MARV VP40 hemmen die Interferon Signalkaskade, verändert nach (Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015).	15
Abbildung 7: Filoviraler Replikationszyklus, verändert nach (Messaoudi, Amarasinghe and Basler, 2015).	16
Abbildung 8: Domänenstruktur der PIAS-Proteine PIAS1 und PIAS2, modifiziert nach <i>Shuai et. al</i> (Shuai and Liu, 2005).	19
Abbildung 9: Enzymatische Schritte der Sumoylierung (Shuai and Liu, 2005).	20
Abbildung 10: Domänenstruktur von SETDB1.	25
Abbildung 11: Aufbau und Funktionsweise des MARV Minigenom-Assays.	62
Abbildung 12: Klonierung, Expression und Analyse von MARV VP30 im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay.	68
Abbildung 13: Expression und Lokalisation von <i>Flag</i> mPIAS1, <i>Flag</i> PIAS2 α , <i>Flag</i> PIAS2 β und <i>Flag</i> SETDB1 in humanen Zellen.	70
Abbildung 14: KoIP-Analysen zur Interaktion von PIAS1, PIAS2 mit MARV oder EBOV VP30.	72
Abbildung 15: KoIP-Analysen zur Charakterisierung der Bindungsstelle des MARV VP30 für PIAS2 β	74
Abbildung 16: Immunfluoreszenzanalysen von MARV VP30, NP und PIAS2 β	77
Abbildung 17: Kollisionsanalyse von PIAS2 β und VP30 mittels Pearson Koeffizient.	78
Abbildung 18: Hemmung der Interferon- β Antwort durch PIAS Proteine.	80
Abbildung 19: Einfluss von PIAS Proteinen und SETDB1 auf die filovirale Transkription.	84
Abbildung 20: MARV Minigenom-Assay in PIAS2-Knockout Zellen, in An- und Abwesenheit von VP30.	86
Abbildung 21: MARV Infektion von HAP1 Parental und PIAS2-KO Zellen.	88
Abbildung 22: Interaktionsnetzwerk.	92
Abbildung 23: Alignment der Aminosäuresequenz von MARV und EBOV VP30, Darstellung relevanter Domänen und Motive und der Bindungsstelle von PIAS2.	95
Abbildung 24 Arbeitsmodell für die Interaktion von MARV VP30 und PIAS2.	106
 Tabelle 1: Reportergene im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay	52
Tabelle 2: Erforderliche Plasmide für MARV Minigenom-Assay.	64
Tabelle 3: Erforderliche Plasmide für EBOV Minigenom-Assay.	64
Tabelle 4: Name, Namensursprung und verwendete Abkürzung der im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay für MARV VP30 gefundenen Interaktionspartner nach UniProt (http://www.uniprot.org/).	67

10. Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSL1-4	<i>Biosafety level 1-4</i> , Biosicherheitsstufe 1-4
Bsp	Beispiel
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CFR	<i>Case fatality rate</i> , Letalitätsrate
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CPE	<i>cytopathic effect</i> , Zytopathischer Effekt
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EBOV	Ebola-Virus
EBV	Epstein-Barr-Virus
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	et cetera
FWD	<i>Forward</i> , Vorwärts
h	Stunde
HAP1	Humane haploide CML Zelllinie
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMT	Histon-Methyl-Transferase
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
Huh7	Humane Hepatomzelllinie
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IFIT2	<i>IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats</i> , Interferon-induziertes Protein mit Tetratricopeptid Wiederholungen
ISG	<i>Interferon-stimulated gene</i> , Interferon-stimuliertes Gen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoIP	Koimmunpräzipitation
MARV	Marburg-Virus
<i>Mating</i>	Paarung von haploiden Hefezellen
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
p. i.	post Infectionem, nach der Infektion
p. T.	post Transfectionem, nach der Transfektion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PCC	<i>Pearson correlation coefficient</i>
PIAS2-KO	PIAS2 Knockout-Zelllinie
PP	Probenpuffer
rcf	relative centrifugal force, Relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RV	<i>Reverse</i> , Rückwärts
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat

sek	Sekunde
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
U	Units
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VLP	<i>Virus-like particle</i> , Virus-ähnliche Partikel
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
α	anti

11. Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Kongresse und Beiträge

- | | |
|---------|---|
| 09/2017 | <p>“PIAS2 and PIAS1, novel filovirus restriction factors”
 <u>Michael Klüver</u> and Stephan Becker
 Posterpräsentation, 9th International Symposium on Filoviruses, Marburg</p> |
| 06/2017 | <p>“PIAS2 and PIAS1, novel filovirus restriction factors”
 <u>Michael Klüver</u> and Stephan Becker
 Vortrag, 36th Annual Meeting American Society for Virology, Madison (WI) USA</p> |
| 03/2017 | <p>“PIAS2 and PIAS1, novel restriction factors of filoviruses?”
 <u>Michael Klüver</u> and Stephan Becker
 Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Marburg</p> |
| 11/2016 | <p>“PIAS2 and PIAS1, novel restriction factors of filoviruses?”
 <u>Michael Klüver</u> and Stephan Becker
 Vortrag, 15th Workshop “Cell Biology of Viral Infections” der Gesellschaft für Virologie, Schöntal</p> |
| 03/2016 | <p>“PIAS2 and PIAS1, novel interaction partners of Ebola and Marburg virus VP30, negatively regulate transcription and replication of filoviruses”
 <u>Michael Klüver</u> and Stephan Becker
 Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Münster</p> |
| 10/2013 | <p>“Screening host cell factors involved in MARV nucleocapsid transport”
 <u>Michael Klüver</u>, Larissa Kolesnikova, Olga Dolnik, Stephan Becker
 Vortrag, Klausurtagung Sonderforschungsbereich 593, Kleinwalsertal</p> |
| 03/2013 | <p>“The influence of Formins on Marburg virus release”
 <u>Michael Klüver</u>, Olga Dolnik, Larissa Kolesnikova, Christian Baarlink, Robert Grosse, Stephan Becker
 Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Kiel</p> |

12. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren in Marburg.

Bauer, Bauer, Becker, Burchert, Brehm, Daut, del Rey, Elsässer, Feuser, Garten, Garn, Glorius, Hassel, Huber, Jacob, Kaufmann, Klenk, Koolman, Maisner Matrosovich, Müller, Müller-Brüsselbach, Moll, Neumüller, Lill, Lohoff, Lohöfer, Preißig-Müller, Renz, Röhm, Schäfer, Schmidt, Schnare, Schulz, Slenczka, Stiewe, Suske, Visekruna, Westermann, Wolff Weber, Weihe, Westermann, Wrocklage, Yu

13. Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Menschen, die mich und meine Arbeit in den vergangenen Jahren unterstützt und begleitet haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stephan Becker für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Vielen Dank für Deine Hilfe und Unterstützung bei der Entwicklung und Ausarbeitung des Themas, für Treffen und Diskussionen bei Fragen und Problemen und für neue Denkanstöße und Ideen.

Ich bedanke mich außerordentlich bei der Jürgen Manchot Stiftung für die großzügige finanzielle Förderung meiner Dissertation.

Ich danke Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk für inspirierende Fragen und Diskussionen und für sein Lebenswerk, ohne das die Virologie in Marburg heute nicht wäre wie sie ist.

Ich danke Dr. Larissa Kolesnikova und Dr. Olga Dolnik für ihre Hilfe und Ideen bei der Ausarbeitung des Promotionsthemas sowie Dr. Hosam Shams-Eldin für die Einführung in die Welt der Hefen und die Beantwortung vieler Fragen.

Ich möchte mich ganz besonders bei Dr. Verena Krähling bedanken, für viele Diskussionen rund um Interferon, Minigenom-Assays, Ko-IPs, für viele großartige Ideen, eine inspirierende Arbeitsweise, Durchführung von Versuchen im Sicherheitslabor, die Übernahme von Korrekturen und dass Du Dir so viel Zeit genommen hast.

Ich möchte mich ganz besonders bei Katharina Kowalski bedanken für ihre theoretische und praktische Hilfe bei Filovirus-qPCRs und Problemen mit dem StepOne, bei der Optimierung von Versuchen und ihrer Hilfe, wenn mal wieder gar nichts mehr ging.

Cornelius Rohde danke ich für die Bereitstellung der VP30-Konstrukte und für viele Diskussionen zu PIAS und UPR. Ich danke Sandro Halwe für die Hilfe bei der effizienten Auswertung von Immunfluoreszenzen mit ImageJ und die Diskussionen rund um Koloalisationen. Darüber hinaus danke ich Euch beiden für die gemeinsame erfolgreiche Durchführung des ersten Young Scientists Symposiums, eine erfolgreiche ASV-Konferenz und für eine gute Stimmung im „Altherrenlabor“.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ke Shuai für die Bereitstellung von PIAS-Konstrukten, sowie Prof. Dr. David Levy, Prof. Dr. Friedemann Weber, und Jennifer Würth für die Bereitstellung des ISG54-Reporters und für die Hilfe und Beantwortung vieler Fragen rund um Interferon und Interferon-Assays.

Ich danke Nelly Berrospi, Dr. Nadine Biedenkopf und Dr. Christian Keller für intensive Diskussionen und neue Blickwinkel rund um Interaktionen, Ko-IPs, RNAs und vieles weitere. Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Becker Astrid, Dirk, Erik, Jaana, Katharina, Anne, Gordian, Alexander, Alexandra, Lucie und Yuki, sowie allen Mitgliedern des Instituts für Virologie für die gute Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Hilfe.

Ich danke ganz besonders meinen Freunden Hanna, Christoph, Max, Thomas, Susan, Michael, Jan, Marc, Michael, Bettina, Alexandra, Daniel, Eva-Lisa, Moritz, Barbara, Denis, Frank, Matthias und Nora für Ideen, Ablenkung, Ratschläge und Korrekturlesen während der gesamten Zeit.

Ganz besonders danke ich meinem Vater für seine immerwährende Unterstützung über all die Jahre, während des Studiums und der Promotion und bei allen Problemen und Deinen Glauben an mich.